

STELLENWERT DER BESTIMMUNG
DER ACETYLCHOLIN-REZEPTOR-
ANTIKÖRPER IN DER DIAGNOSTIK
UND VERLAUFSBEURTEILUNG
DER MYASTHENIA GRAVIS

Kurt Heininger

*Dass
München
1986*

Aus dem Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern
der Universität München

Direktor: Professor Dr.med. M. Knedel

STELLENWERT DER BESTIMMUNG DER ACETYLCHOLIN-REZEPTOR-ANTIKÖRPER
IN DER DIAGNOSTIK UND VERLAUFSBEURTEILUNG DER MYASTHENIA GRAVIS

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Kurt Heininger

aus Düsseldorf

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Fateh-Moghadam

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. M. Knedel

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.1986

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	6
2. Fragestellung	10
3. Materialien	11
4. Methoden	12
4.1 Prinzip des Immunpräzipitationsassay	12
4.1.1. Präparation des Muskelextrakts	12
4.1.2. Markierung von α -Bungarotoxin mit ^{125}J	13
4.1.3. Quantitative Bestimmung des AChR	15
4.1.4. Markierung des Muskelextrakts mit ^{125}J - α -Butx	16
4.1.5. Immunpräzipitationsassay	17
4.1.6. Bestimmung der AChR-Konzentration nach dem Prinzip des Immunpräzipitationsassay	19
4.2. Isolierung von Immunglobulin G aus Serum und Plasmaaustauschfiltraten	19
4.3. Isolierung der Anti-Acetylcholin-Rezeptor-Anti- körper	21
4.4. Immunelektrophorese	22
4.5. Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry	23
4.6. Bestimmung von diagnostischer Empfindlichkeit, Spezifität und Predictive Value	24

4.7.	Bestimmung des klinischen Schweregrades (klinischer Score)	25
4.8.	Statistische Berechnungen	27
4.9.	Plasmaaustauschbehandlungen	28
5.	Patienten	29
6.	Ergebnisse	30
6.1.	AChR aus humanem Skelettmuskel	30
6.2.	Immunpräzipitationsassay	31
6.2.1.	Linearität, Meßbereich, optimale sekundäre Ak-Zugabe	31
6.2.2.	Präzisionskontrolle	33
6.2.3.	Störeinflüsse	34
6.2.4.	Referenzbereich	34
6.2.5.	Antikörper gegen AChR	36
6.2.6.	Diagnostische Zuverlässigkeit	36
6.2.7.	Alter und Geschlecht	38
6.3.	Korrelation zwischen AChR-Ak-Titer und klinischem Schweregrad	39
6.3.1.	Interindividuell	39
6.3.2.	Intraindividuell	40
6.3.2.1.	Langzeitverlauf	40
6.3.2.2.	Plasmaaustauschbehandlung	43
6.4.	Adsorptionschromatographische Reinigung der Anti-AChR-Ak	46

7.	Diskussion	50
7.1.	Der Immunpräzipitationsassay und seine Anwendung in der Diagnostik der MG	50
7.2.	Verlaufsstudien bei Patienten mit MG	56
7.3.	Affinitätschromatographische Reinigung spezifischer Anti-AChR-Ak	58
8.	Zusammenfassung	61
9.	Literaturverzeichnis	64

1. EINLEITUNG

Myasthenia gravis (MG) ist eine neuromuskuläre Erkrankung, die durch Schwäche und belastungsabhängige vorzeitige Ermüdung der Skelettmuskulatur gekennzeichnet ist. Am häufigsten betroffen sind die von den Hirnnerven versorgten Muskeln und hier insbesondere die okulären Muskeln. Entsprechend sind Ptosis und Doppelbilder in 90% der Fälle vorhanden. In manchen Fällen kann die Krankheit einzig auf die Augenmuskeln beschränkt sein (okuläre MG). Bei der generalisierten Verlaufsform sind auch der Stamm und die Gliedmaßen und hier besonders die proximalen Anteile betroffen, daneben können auch Bulbärparesen und Ateminsuffizienz auftreten, bzw. auch ganz im Vordergrund stehen (generalisierte MG) (44). Die Häufigkeit der Erkrankung beträgt 1:20.000 bis 1:30.000. Sie kann in jedem Lebensalter auftreten, Erstsymptome sind aber oft um das 20. Lebensjahr zu beobachten, dann häufiger bei Frauen als bei Männern. Ein weiterer Erkrankungsgipfel ist um das 50. Lebensjahr, wobei Männer bevorzugt befallen werden.

Wegweisend zum Verständnis der Pathogenese der Erkrankung war die Erkenntnis, daß die Störung weder im Muskel noch im Nerven zu suchen war, sondern an der neuromuskulären Übertragungsstelle, der Synapse. Erste Anhalte dafür ergaben sich aus der Ähnlichkeit der Erkrankung mit einer Curare-Vergiftung und den günstigen

Wirkungen von Cholinesterasehemmern auf die Krankheitssymptome (69).

Aufgrund widersprüchlicher pharmakologischer Befunde war es lange Zeit umstritten, ob letztendlich prä- oder postsynaptische Vorgänge gestört waren. Erst mit Hilfe von Polypeptiden aus Schlangengiften, die sich spezifisch und irreversibel an das Acetylcholin-Rezeptor (AChR)-Protein binden (32), konnte diese Frage geklärt werden. So konnten Fambrough et al. (1973) zeigen, daß bei Patienten mit MG die Konzentration von AChR in der postsynaptischen Membran deutlich vermindert ist (20). Zusätzlich konnten Engel und Santa (1971) zeigen, daß die postsynaptische Membran bei MG ultrastrukturell verändert ist (17).

Die Pathogenese dieser Veränderungen blieb aber weiterhin unklar. Schon 1960 hatte Simpson die Hypothese aufgestellt, daß die MG eine Autoimmunerkrankung ist (55). In diese Richtung hatten schon früh folgende klinische Beobachtungen hingedeutet:

1. Das gemeinsame Vorkommen mit anderen Autoimmunerkrankungen bzw. -phänomenen,
2. das Auftreten von Thymusveränderungen in etwa 80 % der Fälle, wobei es sich zu 85 % um Thymushyperplasien und zu 15 % um Thymome handelt (9),
3. der günstige Effekt der Thymektomie auf den Krankheitsverlauf (64),

4. das Vorkommen von Serumantikörpern gegen quergestreifte Muskulatur in einem Drittel aller Patienten, wie sich aus Immunfluoreszenzuntersuchungen ergab (56),
5. der günstige Effekt der Immunsuppression auf den Krankheitsverlauf (12, 40),
6. die genetische Prädisposition für MG mit einer Erkrankungsinzidenz von 3 % in Verwandten von MG-Patienten, während die sonstige Inzidenz 0.01 % ist,
7. die 1 1/2-fach höhere Prävalenz der Erkrankung bei Frauen.

Drei entscheidende Befunde machten dann innerhalb kurzer Zeit die Autoimmungenese der MG wahrscheinlich:

1. Bei dem Versuch, durch Immunisierung von Kaninchen mit hochgereinigtem AChR aus elektrischen Organen von Fischen Antikörper (Ak) gegen AChR herzustellen, induzierten Patrick und Lindstrom und unabhängig davon Sugiyama et al. (1973) ein myasthenieähnliches Krankheitsbild (45, 57). Die chronische Phase dieser experimentell allergischen Myasthenia gravis (EAMG) zeigt weitgehende Übereinstimmungen mit der humanen Erkrankung hinsichtlich der klinischen, neurophysiologischen, morphologischen und immunologischen Befunde.
2. Durch passive Übertragung von IgG aus Patientenseren gelang es Toyka et al. (1975) in Mäusen ein myasthenisches Syndrom zu erzeugen, und damit das vierte der Koch-Witebski'schen Postulate

zu erfüllen (59).

3. Lindstrom et al. und Mittag et al. entwickelten 1976 einen Immunpräzipitationsassay zur quantitativen Bestimmung von Acetylcholinrezeptor-Antikörpern (AChR-Ak) mit dem sie im Serum von ca. 85 % der Patienten mit MG erhöhte Ak-Titer feststellen konnten (36, 41).

Somit war nicht nur die autoimmune Pathogenese der Erkrankung belegt, sondern auch der AChR als Antigen, gegen das die Immunreaktion gerichtet ist, identifiziert worden (67). Die im Serum von Myasthenie-Patienten nachgewiesenen AChR-Ak waren folglich nicht als Epiphänomen anzusehen, im Gegensatz zu den schon früher immunfluoreszenzchemisch gefundenen Muskel-Ak. In Anbetracht der hohen Prozentzahl positiver AChR-Ak bei Patienten mit MG und Fehlen falsch positiver Titer in den Kontrollen wurde schon von den Erstbeschreibern auf die mögliche Bedeutung des Immunpräzipitationsassays in der Diagnostik der MG hingewiesen.

2. FRAGESTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es,

1. eine routinemäßig anwendbare, vereinfachte Modifikation des Immunpräzipitationsassays auf Ak gegen AChR zu entwickeln und die Methode zu evaluieren,
2. die diagnostische Empfindlichkeit und Spezifität des Tests zu bestimmen,
3. festzustellen, ob intra- und interindividuell eine Beziehung zwischen Antikörper-Titer und klinischem Schweregrad der MG besteht, und
4. spezifische AChR-Ak zu reinigen.

3. MATERIALIEN

Die verwendeten Materialien und ihre Bezugsquellen:

DEAE-Zellulose Filterpapier DE 81	Whatman/Maidstone, England
a-Bungarotoxin	Boehringer/Mannheim
^{125}J -a-Bungarotoxin	NEN Radiochemicals/Boston, USA
PMSF	Sigma/Taufkirchen
Triton X-100	Serva/Heidelberg
Sephadex CM 50	Pharmacia/Freiburg
DEAE Sephacel	Pharmacia
CH-aktivierte Sepharose 4 B	Pharmacia
Biogel P4	Biorad/München
Partigenplatten	Behring/Frankfurt a.M.
Anti-Human IgG	Behring
Anti-Human-Serum	Behring
Plasmaflow ^R Hollow-Fiber-Filter	Asahi medical/Tokio, Japan

alle anderen Substanzen waren vom Reinheitsgrad p.a. und wurden von Merck/Darmstadt bezogen.

4. METHODEN

4.1. Prinzip des Immunpräzipitationsassay

Alpha-Bungarotoxin (α -Butx), ein Schlangentoxin, das sich wie bereits oben erwähnt, hochspezifisch, quantitativ und fast irreversibel an den nikotinischen AChR bindet, dient ^{125}J -markiert als Marker für den AChR. Bei Inkubation mit Patientenserum binden sich anti-AChR-Ak an den markierten Rezeptor. Dieser Komplex wird mit anti-human-IgG ausgefällt, abzentrifugiert, gewaschen und im γ -Counter gemessen. Die gemessene Radioaktivität gilt als Maß für die Ak-Konzentration.

4.1.1. Präparation des Muskelextraktes

Frisches Muskelgewebe von amputierten menschlichen Gliedmaßen (arterielle Verschlusskrankheiten bei diabetischer oder arteriosklerotischer Vaskulopathie) wurde entweder bei -80°C gelagert oder sofort bei 4°C verarbeitet (Abb. 1). Ca. 1 kg Muskel wurden in 2 l PBS (10 mM Natriumphosphat pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,2 % Natriumazid) bei 4°C homogenisiert (Sorvall Homogenisator oder Cenco Virto-Mix, 5 min. bei max. Geschwindigkeit), und das Rohhomogenat 30 min. bei 20.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 l PBS, das 2 % Triton X-100

enthielt, erneut homogenisiert und über Nacht bei 4° C geschüttelt. Der durch Zentrifugation bei 40.000 g für 30 min. erhaltene klare Überstand wurde ohne oberste Lipidschicht gesammelt, in Aliquots von 100 ml aufgeteilt und bei -80° C gelagert.

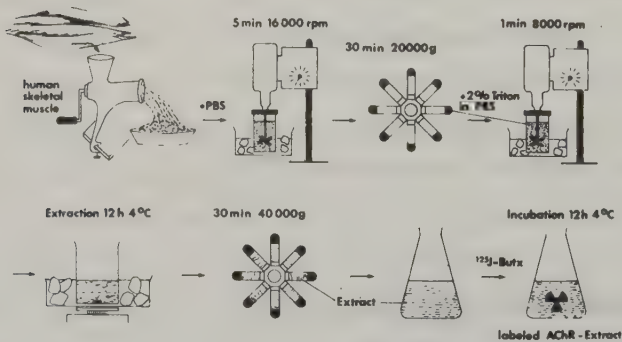


Abb. 1: Präparation eines Detergentien-Extrakts aus humaner Skelettmuskulatur

4.1.2. Markierung von α -Bungarotoxin mit ^{125}J (20)

200 μg α -Butx wurden in 0,2 ml 0,2 M NaPhosphatpuffer pH 7,2 gelöst. Dazu wurden 3 bis 3,5 mCi ^{125}J und 10 μl einer frisch angesetzten 10 mM Chloramin T-Lösung gegeben. Nach 10 min. wurde die Reaktion

durch Zugabe von 10 μ l einer ebenfalls frisch angesetzten 20 mM Natriumdisulfidlösung und von 20 μ l einer 1 mM KJ-Lösung gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine Biogel P4-Säule (1 x 24 cm, 5 g Biogel in Startpuffer) aufgetragen und mit 0,05 M NH_4Ac Puffer pH 5,0 eluiert. Die Elution wurde mit einem Geigerzähler verfolgt und das Eluat beim ersten Auftreten von Radioaktivität in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen des 1. Radioaktivitätspeaks (^{125}J -a-Butx) wurden ohne den absteigenden Schenkel gepoolt. Das markierte ^{125}J -a-Butx wurde dann auf eine Sephadex CM 50 Säule aufgetragen (1,5 x 30 cm, 5g Austauscher in Startpuffer), und die Säule mit 0,05 M NH_4Ac -Puffer pH 5,0 gewaschen. ^{125}J -a-Butx, das im oberen Teil der Säule gebunden blieb, wurde mit einem Gradienten von 0,05 M NH_4Ac pH 5,0 bis 1,0 M NH_4Ac pH 6,8 eluiert. Der Radioaktivitätspeak wurde in 2 ml Fraktionen aufgefangen und ohne die Röhrchen des absteigenden Schenkels gepoolt. Die spezifische Aktivität von ^{125}J -a-Butx wurde durch Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (39) und Messung der Radioaktivität in 10 μ l erhalten und betrug 1 bis 4 x 10^4 Ci/mol. Das Material wurde bei -20°C gelagert. In späteren Untersuchungen wurde alternativ kommerzielles ^{125}J -a-Butx (NEN) eingesetzt.

4.1.3. Quantitative Bestimmung des AChR (29)

Zur quantitativen Bestimmung des AChR-Gehalts der Muskelextrakte wurden jeweils 100 μl Extrakt mit 5 pmol ^{125}J -a-Butx (entsprechend ca. 5 μl mit einer spez. Aktivität von $1\text{--}4 \times 10^4 \text{ Ci/mol}$) versetzt. Die Lösung wurde mit PBS-0.2 % Triton X-100 auf 200 μl Endvolumen gebracht und 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. 2 DEAE-Zellulose Papierscheiben DE 81 (2,3 cm Durchmesser) wurden auf eine Porzellannutsche aufgebracht. Über eine Waschflasche wurde Vakuum angelegt, und die Filterscheiben mit ca. 10 ml PBS-0.2 % Triton gewaschen. Die Inkubationslösung wurde sodann über die Filterpapiere filtriert, mit 25 ml PBS-0.2 % Triton nachgewaschen und im γ -Counter die an den Filtern adsorbierte Radioaktivität gezählt. Der Gehalt an AChR berechnet sich nach der Formel

$$\frac{(\text{CPM}_{\text{Probe}} - \text{CPM}_{\text{leer}}) \times N_0/N_t}{\text{Extraktvolumen} \times \text{spezifische Aktivität } ^{125}\text{J-a-Butx} \times Z \times K}$$

= Konzentration AChR ($10^{-9} \text{ mol a-Butx-Bindungsstellen/l}$)

CPM = gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute

N_0 = Zahl der Radionukleide zum Zeitpunkt 0

N_t = Zahl der Radionukleide zum Zeitpunkt t

Z = Zählerausbeute des γ -Counters (z.B. 0,66)

K = Umrechnungskonstante von Zerfälle pro Minute in Curie

(= $2,22 \times 10^{12} \text{ DPM/Ci}$)

Dieser Filterscheibenassay konnte mit dem käuflichen ^{125}J -a-Butx nicht durchgeführt werden. Durch unspezifische Bindung des Butx an Albumin, das der Probe zur Stabilisierung zugesetzt wurde, kam es zu einem hohen Background adsorbierter Radioaktivität an den Filterscheiben, der eine reproduzierbare quantitative AChR-Bestimmung nicht zuließ. Zur quantitativen Bestimmung der AChR diente deshalb später der für diesen Zweck leicht modifizierte Immunpräzipitationsassay, der auf Seite 16 beschrieben wird.

4.1.4. Markierung des Muskelextrakts mit ^{125}J -a-Butx

Zuerst im Filterassay, später im Immunpräzipitationstest unter AChR-Ak Überschuß, wurde der Rezeptorgehalt des Extrakts bestimmt. Nach der einfachen Formel:

$$^{125}\text{J}\text{-a-Butx (ul)} = \frac{4 \times \text{Extraktvol. (ml)} \times \text{AChR-Konz. (pmol/ml)}}{^{125}\text{J}\text{-a-Butx-Konz. (fmol/ml)}}$$

wurde der Rezeptor mit einem 4-fachen molaren Überschuß an ^{125}J -a-Butx versetzt und über Nacht bei 40°C inkubiert. Zweckmäßigerweise wurde in einem Ansatz die Extraktmenge, die dem Verbrauch von 2 Wochen entsprach, markiert und bei 40°C gelagert. Unter diesen Bedingungen konnte in diesem Zeitraum immunochemisch kein Verlust von AChR beobachtet werden.

4.1.5. Immunpräzipitationsassay (modifiziert nach 36)

In Doppelbestimmungen wurden je 5 μ l Serum mit 200 μ l 125 J-a-Butx-markiertem Extrakt versetzt und über Nacht bei 4° C inkubiert (Abb. 2). In jeder Serie wurden zur Qualitäts- und Richtigkeitskontrolle Seren mit bekannter Ak-Konzentration und ein gepooltes Normalserum mitgeführt. Der 125 J-a-Butx-AChR-Ak-Komplex wurde mit einer optimalen Menge Anti-Human-IgG-Serum vom Kaninchen bei 4°C 4 h inkubiert und dabei ausgefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (2000 g, 30 min.), die Überstände abgesaugt, und die Pellets mit 1 ml PBS-0,2 % Triton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und die Radioaktivität des Pellets im γ -Counter gezählt. Die Ak-Konzentration errechnet sich aus der Differenz der Radioaktivität von Probe und Leerwert (ohne Serum) und wird in 10^{-9} mol a-Butx-Bindungsstellen pro Liter Serum angegeben.

$$\frac{(\text{CPM}_{\text{Probe}} - \text{CPM}_{\text{Leer}}) \times N_0/N_t}{\text{Serumvolumen} \times \text{spez. Akt. } ^{125}\text{J-a-Butx} \times Z \times K} \\ = \text{Konz. AChR-Ak } (10^{-9} \text{ mol a-Butx-Bindungsstellen/l})$$

Die bei jeder Serie mitgeführten Leerwerte wurden ohne Serum angesetzt, aber ansonsten identisch behandelt und sollten für unspezifisch am Pellet adsorbierte Radioaktivität korrigieren.

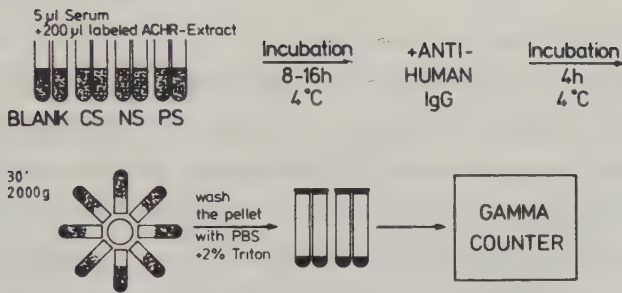


Abb. 2: Modifizierter Immunpräzipitationsassay nach Lindstrom.

Blank = Leerwert, CS = Kontrollserum, NS = Normalserum,
PS = Patientenserum

Die ersten Bestimmungen wurden zur Qualitätskontrolle parallel mit der Arbeitsgruppe um J. Newsom-Davis und A. Vincent, London durchgeführt, die kurz zuvor den von Lindstrom et al. beschriebenen Immunpräzipitationsassay aufgebaut hatten.

4.1.6. Bestimmung der AChR-Konzentration nach dem Prinzip des Immunpräzipitationsassay

Um die ^{125}J -a-Butx markierten AChR quantitativ auszufällen, wurden die AChR-Ak in großem Überschuß zugesetzt. Dazu wurden 20 μl eines hochtitrigen Myasthenie-Serums mit 30 μl Muskelextrakt inkubiert und der Immunpräzipitationsassay wie oben beschrieben durchgeführt. Zur Berechnung der AChR-Konzentration wurde in der obigen Formel das Volumen des Serums durch das eingesetzte Volumen des Muskelextrakts ersetzt.

4.2. Isolierung von Immunglobulin G aus Serum und Plasmaaustauschfiltraten (46)

DEAE-Sephacel^R, das bereits gequollen als Suspension in Äthanol geliefert wird (Pharmacia), wurde unter fünfmaligem Wechsel der Waschflüssigkeit (jeweils 5 l) mit dest. H_2O gewaschen und danach mit 0.01 M Naphosphat pH 8.0 äquilibriert.

Dann wurde das Gel in einem druckstabilen Erlenmeyerkolben entgast und in die Säule überführt. Das Gel wurde unter einem Druck gepackt, der dem Druck einer Wassersäule von der zweifachen Höhe der Chromatographiesäule (Säulentyp K120/50 oder 70/25) entsprach. Nach dem Packen wurde das Gel mit dem Startpuffer von 0.01 M Naphosphat pH 8.0 gewaschen.

Serum oder Plasma wurde gegen 0.01 M Naphosphatpuffer pH 8.0

Das Lysozym und das Chymotrypsin des Hühner-Eiweißes wurden in 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) gelöst und auf die Säule aufgetragen und mit einem Gradienten aus 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) und 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) eluiert. Die IgG-Moleküle sind als kleine Proteine beim pH 7,4 nicht oder nur wenig geladen und werden daher vom Ionenaustauscher nicht adsorbiert, während die restlichen Serumeiweiße als Anionen vorliegen und vom Anionenaustauscher zurückgehalten werden. IgG wurde bereits bereits vom Gelfiltrationsmedium eluiert, die anderen Proteine eluieren erst nach dem Pufferwechsel im Eluat. Die Extinktion des Eluates wurde bei 280 nm kontinuierlich gemessen (Ulrich, 1978) und am Ende des Laufes aufgezeichnet. Das Eluat wurde in Fraktionen von 20 ml aufgefangen. Die IgG-enhaltenden Fraktionen wurden gepoolt und in der Ultrafiltrationszelle (Amicon, Membran PM 30) konzentriert. Das konzentrierte Material wurde immunoelektrophoretisch gegen polyvalentes Anti-Maus-Serum auf Reinheit untersucht (52), in der radialen Immunodiffusion nach Mancini der Gehalt an IgG bestimmt (2) und im Immunpräzipitationstest der spezifische AChE-Aktivität getestet.

4.3. Isolierung der Anti-Acetylcholin-Rezeptor-Antikörper

5 g aktivierte CH-Sepharose 4B wurden in 50 ml 1 mM HCl 10 min lang gequollen und auf einer G3 Glasfritte mit 200 ml 1 mM HCl pro g Gel unter Anlegen eines Vakuums gewaschen. In einem 100 ml Rundkolben wurden 2 mg α -Butx in 25 ml 0,1 M NaHCO_3 pH 8,0 gelöst, das gewaschene Gel wurde in den Rundkolben überführt, und das Gemisch bei RT 1 h lang leicht geschüttelt. Die Suspension wurde mit dem NaHCO_3 -Puffer auf der Fritte gewaschen, die Waschflüssigkeit gesammelt und ihr Proteingehalt bestimmt. Um noch aktivierte Valenzen auf dem Gel abzusättigen, wurde es mit 100 ml 1 M Äthanolamin pH 9,0 bei RT 30 min. inkubiert. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das Gel wurde abwechselnd mit 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 1 M NaCl und 0,1 M NaAc pH 4,0, 1 M NaCl gewaschen, wobei 3 Waschzyklen durchgeführt wurden, und dann in einen 2 l Rundkolben überführt. Ein ungereinigter AChR-Extrakt (Gesamtgehalt entsprechend 1 nMol α -Butx-Bindungsstellen) wurde zum Gel gegeben, die Mischung über Nacht geschüttelt, auf der Glasfritte das Gel vom Extrakt abgetrennt und mit 1 l PBS-2% Triton gewaschen. Extrakt und Waschflüssigkeit wurden vereinigt und ihr Rezeptorgehalt im Immunpräzipitationstest bestimmt. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch extensives Waschen des Gels mit PBS-1 M NaCl-0,2% Triton desorbiert. Um den Rezeptor gegen die denaturierenden Bedingungen des Elu-

tionsschrittes zu stabilisieren, und um die gebundenen Proteine quervernetzten, wurde das Gel 10 min. in 100 ml 0,1 % Glutardialdehyd suspendiert und anschließend die noch vorhandenen Monovalenzen des Glutardialdehyds 2 h mit 0,5 M Glycin in PBS abgesättigt. Diese Reaktion wurde durch Waschen mit PBS-Triton beendet. In einem Rundkolben wurde das Gel in PBS-2% Triton mit IgG aus einem Myastheniker-Serum über Nacht geschüttelt. Das molare Verhältnis von Ak zu AChR betrug dabei 5:1. Auf der Glasfritte wurde das Gel dann erneut abgetrennt, mit Detergenzpuffer gewaschen und unspezifisch gebundenes IgG durch extensives Waschen mit PBS-1 M NaCl-0,2% Triton entfernt. Die Elution der spezifisch am Rezeptor gebundenen Ak wurde mit 3 M NaSCN in PBS erreicht. Das Eluat wurde auf seinen Ak-Gehalt getestet, in einer Amicon-Zelle über eine YM 30 Membran konzentriert und gegen 0,9 %ige NaCl dialysiert. Im Immunpräzipitationsassay wurde das Konzentrat erneut auf seinen AChR-Ak-Gehalt getestet und in der radialen Immundiffusion nach Mancini (LC-Partigen) sein IgG-Gehalt bestimmt.

4.4. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde nach Grabar und Williams (23) in der Modifikation von Scheidegger (52) auf einem Camag-System durchgeführt.

4.5. Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry (39)

Dieses sehr empfindliche Verfahren, dessen Chemismus noch immer nicht völlig verstanden wird, benutzt die Reduktion von Phosphorwolframsäure (Folin-Ciocalteus-Reagenz) durch die aromatischen Aminosäuren als farbgebende Reaktion.

Reagenzien:

- 1) 40 g Na_2CO_3 in 500 ml 0.1 N NaOH
- 2) 0.5 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ und 1.0 g K-Na-Tartrat in 100 ml 0.1 N NaOH
- 3) Folin-Ciocalteus-Reagenz mit dest. H_2O auf 1 N Säure eingestellt.

Das alkalische Cu-Tartrat Reagenz bestand aus 50 ml Reagenz 1) und 1 ml Reagenz 2). Die Mischung wurde immer frisch angesetzt. Zu 0.1 ml Probe, die 2,5 bis 50 μg Protein enthielt (oder zu 0.1 ml H_2O als Leerwert), wurden 0.5 ml Cu-Tartrat-Reagenz gegeben, es wurde gemischt und 10 min bei RT stehengelassen. Dann wurden 50 μl Folin-Ciocalteus-Reagenz zugefügt, gut durchgemischt und nach 30 min im Photometer in einer 1 cm x 0,5 cm Küvette bei 578 nm die Extinktion der Probe gegen den Leerwert gemessen.

Eine Eichkurve wurde mit einer Lösung aus kristallisiertem Rinderserumalbumin in PBS erstellt (400 mg/ml).

4.6. Bestimmung von diagnostischer Empfindlichkeit, Spezifität und Predictive Value (8, 63)

Um die Wertigkeit eines Tests für die Diagnostik einer Krankheit zu bestimmen, ist es üblich, den Test an zwei ausgewählten Kollektiven anzuwenden: eine Gruppe mit einer anderweitig gesicherten Krankheitsdiagnose, und eine andere Gruppe ohne Symptome dieser Krankheit und ohne erhöhtes Erkrankungsrisiko. Die Testergebnisse werden dichotom als "positiv" oder "negativ" ausgedrückt. Die Zuverlässigkeit eines Tests, erkrankte von nicht erkrankten Personen zu unterscheiden, kann durch seine Empfindlichkeit und Spezifität ausgedrückt werden.

Empfindlichkeit ist dabei die Fähigkeit des Tests, bei einer sicher an der untersuchten Krankheit erkrankten Person einen positiven Befund zu ergeben. Ihr numerischer Wert berechnet sich aus

$$\text{Empfindlichkeit} = \frac{\text{erkrankte Personen mit positivem Test}}{\text{alle getesteten erkrankten Personen}}$$

Spezifität ist die Fähigkeit des Tests, bei nicht an der untersuchten Krankheit erkrankten Personen einen negativen Befund zu ergeben. Ihr numerischer Wert berechnet sich aus

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{nicht erkrankte Personen mit negativem Test}}{\text{alle getesteten nicht erkrankten Personen}}$$

Die diagnostische Aussagekraft eines Tests kann durch den "Predictive Value" zahlenmäßig erfaßt werden (63). Der Predictive Value eines positiven Tests drückt dann aus, mit welcher Sicherheit ein positiver Test ein erkranktes Individuum erfaßt.

$$\text{Predictive Value}(+) = \frac{\text{Zahl der erkrankten Personen mit pos. Test}}{\text{Gesamtzahl der Personen mit pos. Test}}$$

Der Predictive Value eines negativen Tests sagt aus, mit welcher Sicherheit ein negativer Test eine Person als nicht erkrankt einordnet.

$$\text{Predictive Value}(-) = \frac{\text{Zahl der nicht erkrank. Pers. mit neg. Test}}{\text{Gesamtzahl der Personen mit neg. Test}}$$

4.7. Bestimmung des klinischen Schweregrades (klinischer Score)

Die klinischen Untersuchungen wurden nach einem standardisierten Untersuchungsprogramm, zur gleichen Tageszeit und innerhalb von 3 Stunden nach der letzten Pyridostigmin-Dosis durchgeführt (Tab. 1). Die Ermüdbarkeit der Muskulatur wurde weitgehend quantitativ erfaßt. Wo dies nicht möglich war, wie bei der facio-pharyngealen Muskulatur, wurden semiquantitative klinische Befunde zur Beurteilung herangezogen.

1. Generalisierte Symptome				
1.1 Extremitäten und Rumpfmuskulatur				
Scorewertskala	Ohne Symp. 0	Ausprägung der Schwäche		
		Gering 1	Mäßig 2	Stark 3
Armvorhalten (90° stehend)	> 240	> 90-240	> 10-90	< 10
Beinvorhalten (45° Rückenlage)	> 100	> 30-100	> 0-30	0
Kopfheben (45° Rückenlage)	> 120	> 30-120	> 0-30	0
Treppensteigen (10 Stand.Stufen ohne Hände)	< 6	> 6-10	> 10-30	Unmöglich > 30
Vigormetertest (Dekrement nach 10 max. Faustschlüssen)	< 10%	> 10-20%	> 20-75%	> 75%
Vitalkapazität (max. Exspir. nach max. Inspir.)	δ > 3.5L	> 2,5-3,5L	> 1,5-2,5L	< 1,5L
	η > 2,5L	> 1,8-2,5L	> 1,2-1,8L	< 1,2L
1.2 Facio-pharyngeale Muskulatur				
Gesichtsmuskulatur	Normal	Mim.Schwäche (Lidschluß-Test. 1,0)	Lidschluß inkomplett 1,0 deutl. eingeschr.)	Amimie
Kauen	Normal	Kauschwäche (Ermüdung während Essen)	Zerkleinerte Kost	Magensonde
Schlucken	Normal	Erschwert (Ermüdung bei Essen und Trinken)	Inkompl. Gaumenschluß (Häufiges Verschlucken, nasale Sprache)	Magensonde
2. Okuläre Symptome				
Doppelbilder	> 60	> 10-60	> 0-10	Spontan
Ptoxis	> 60	> 10-60	> 0-10	Spontan

Tab. 1: Score-Werttabelle des klinischen Befundes. Der Score-Wert ergibt sich aus der Summe der Gewichte der Einzelparameter geteilt durch die Zahl der gemessenen Parameter. Bei okulären MG wurden nur die Untersuchungen der 2. Gruppe gewertet. Veränderung des Score-Wertes $< \pm 0.3$ = klinisch nicht wesentlich geändert; $\pm 0.3 - 1$ = klinisch mäßig geändert; $> \pm 1.0$ = klinisch deutlich verändert.

Normalwerte für die Einzelparameter wurden an 64 Patienten ohne Muskelschwäche erhoben. Ein Wert unterhalb der 90 Perzentile des Normalbereiches wurde als Normgrenze des MG-Score eingesetzt. Die Bewertung der einzelnen gemessenen Parameter erfolgte in einer 4-Stufen-Skala. Aus der Summe der einzelnen Bewertungsziffern, geteilt durch die Anzahl der gemessenen Parameter, wurde der Scorewert gebildet. Die Differenz der Score-Werte aus 2 aufeinanderfolgenden Untersuchungen wurde als klinische Veränderung bewertet. 12 Patienten wurden zum gleichen Kontrolltermin von mehreren Untersuchern getestet. Der Variationskoeffizient war hierbei weniger als 10 % zwischen den einzelnen Untersuchern.

4.8. Statistische Berechnungen

Die Korrelationsanalyse zwischen Veränderungen von aufeinanderfolgenden Ak-Titern und entsprechenden klinischen Score-Werten wurde für jedes Zeitintervall mit einem bivariaten Plotting Programm (BMD P6D) auf einem Siemens 40004/151 Computer durchgeführt. Nur Zeitintervalle mit definitiven Veränderungen entweder des klinischen Scores ($\text{Diff} > \pm 10\%$) oder des Ak-Titers ($\text{Diff} > \pm 5\%$) wurden einbezogen.

4.9. Plasmaaustauschbehandlungen

Insgesamt wurden 50 Plasmaaustauschbehandlungen (PE) durchgeführt. 25 mal wurden dabei Zellseparatoren eingesetzt. 25 mal wurde ein Dialyse-ähnliches Verfahren mit Hollow-Fiber-Filtern angewendet. Das Hollow-Fiber-Filter besteht aus einem Bündel dünner Zellulose-diazetat-Schläuche mit einer Wandstärke von 160 μm , einer effektiven Gesamtoberfläche von 0.65 m^2 und einer maximalen Porengröße von 0.2 μm . Makromoleküle bis zu einem Molekulargewicht von 3×10^6 Dalton können mit diesem Filter aus dem Blut entfernt werden. Bei einem veno-venösen oder arterio-venösen Blutfluß von 100 ml/min betrug der Plasmafluß etwa 30 ml/min. Zur Antikoagulation wurden mindestens 5.000 Einheiten Heparin gegeben. 5 %ige Humanalbuminlösung diente als Ersatz zum Ausgleich der Proteinverluste.

5. PATIENTEN

Für die Studie zur Bestimmung der diagnostischen Wertigkeit des Immunpräzipitationsassays wurden 201 Patienten (122 Frauen, 79 Männer) mit klinisch und elektromyographisch gesicherter MG untersucht. 27 Patienten davon hatten eine ausschließlich okuläre Symptomatik, 169 zeigten eine generalisierte Form, 5 waren in Remission. Als Referenzkollektiv dienten 37 klinisch und laborchemisch gesunde Personen, 67 Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen (progressive systemische Sklerose, n=16; systemischer Lupus erythematodes, n=21; Poly- und Dermatomyositiden, n=30), 5 Patienten mit Thymomen ohne MG, 31 Patienten mit anderen neuromuskulären Erkrankungen sowie 58 Patienten ohne MG, bei denen immunfluoreszenzchemisch Antikörper gegen quergestreifte, glatte oder cardiale Muskulatur nachgewiesen worden waren.

Für die Verlaufsuntersuchungen wurden 50 Patienten (27 männlich, 23 weiblich) mit gesicherter MG über einen Zeitraum von 6-36 Monaten verfolgt. Alle Patienten standen unter einer Basistherapie mit Pyridostigmin (240 - 800 mg/die), 7 wurden mit Prednison behandelt (20 - 50 mg jeden 2. Tag), 25 erhielten Azathioprin (2 - 2,5 mg/kg KG), 8 wurden thymektomiert und 6 zusätzlich kurzfristig mit Plasmaaustausch behandelt. 45 Patienten ohne Muskelschwäche und 19 gesunde Probanden dienten als Referenzkollektiv zur Erstellung des Score-Normalbereichs.

6. ERGEBNISSE

6.1. AChR aus humanem Skelettmuskel

Mit 2 % Triton X-100 haltigem PBS ließen sich 0.3 - 2 pmol AChR pro g feuchtes Muskelgewebe extrahieren. Aus Amputaten von Patienten mit diabetischer Angiopathie und Polyneuropathie ließ sich mehr AChR extrahieren als aus Amputaten von Patienten mit arteriosklerotischen Durchblutungsstörungen (1 - 2 pmol gegenüber 0.3 - 1.2 pmol). Die Extrakte waren bei -80°C im Mittel 1.5 - 2 Jahre lang haltbar. Aufgetaut, radioaktiv markiert und bei 4°C gelagert, waren sie 3-4 Wochen zu verwenden.

Die Verwendbarkeit der Extrakte wurde nicht so sehr eingeschränkt durch eine Proteolyse der Rezeptormoleküle, sondern vielmehr durch Bildung partikulärer Bestandteile im Extrakt, die einen Teil der AChR adsorbierten und im Test zu hohen und uneinheitlichen Leerwerten führten.

Insgesamt wurden 15 Extrakte hergestellt. Es zeigte sich, daß einzelne Myastheniker-Seren mit Muskelextrakten aus einzelnen Amputaten sehr unterschiedliche Ak-Titer ergaben. Wir führten das auf ein unterschiedliches Ak-Spektrum in verschiedenen Seren zurück, das nicht von allen Einzelextrakten ausreichend quantitativ erfaßt wurde. Durch routinemäßige Verwendung gepoolter Extrakte mit bis zu 5 gleichzeitig aufgearbeiteten Amputaten konnten bei allen Seren quantitativ besser reproduzierbare Werte bestimmt werden.

6.2. Immunpräzipitationsassay

6.2.1. Linearität, Meßbereich, optimale sekundäre Ak-Zugabe

Vor der routinemäßigen Verwendung eines Muskelextrakts mußte der Immunpräzipitationsassay in einer Reihe von Vorversuchen optimiert werden. Zunächst wurde der Linearitätsbereich ausgetestet. Mit steigenden Verdünnungen hoch- und mitteltitriger Patientenserum wurden Bindungskurven erstellt (Abb.3), die typischerweise in ihrem Anfangsteil einen linearen Bereich aufweisen, um dann in ein Plateau überzugehen. Nur im linearen Bereich ist eine quantitative Bestimmung der Ak-Titer sinnvoll, da nur hier die Bindungspartner mit konstanter Stöchiometrie reagieren, und ein definiertes Mehr an Ak zu einem reproduzierbaren Zuwachs an präzipitierten Counts führt. Ein Austesten jenseits dieses Bereichs hat falsch niedrige Titer zur Folge, Patientenserum mit höheren Aktivitäten müssen deshalb entsprechend verdünnt werden. Der lineare Bereich bewegte sich für einen Extrakt mittleren AChR-Gehalts und 200 µl Extraktvolumen zumeist zwischen 0 und 1,5 nmol a-Butx-Bindung/l. Es zeigte sich, daß bei gleichem AChR-Gehalt die gepoolten Muskelextrakte einen größeren Linearitätsbereich hatten, als Muskelextrakte aus nur einem Amputat. Darüberhinaus zeigten aber auch einzelne Seren einen engeren oder auch weiteren

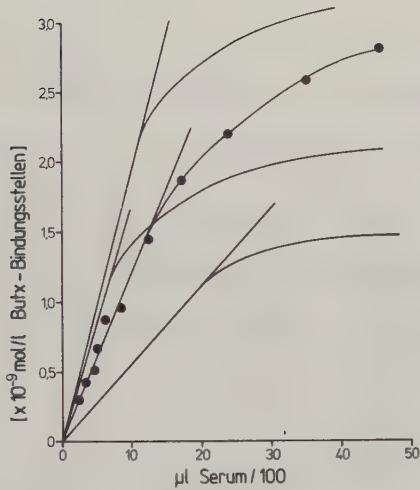


Abb. 3: Bindungskurven zur Bestimmung des linearen Bereichs mit konstanter Stöchiometrie zwischen AChR und Ak.

linearen Bereich (Abb. 3). Die obere Meßbereichsgrenze wurde deshalb mit 1 nmol/l festgelegt.

Zusätzlich mußte die, für die Präzipitation des AChR-Ak-Komplexes optimale Anti-Human-IgG Menge ermittelt werden. Wegen der Serumverdünnungen mit PBS geschah dies für verschiedene Verdünnungsstufen gesondert. Es erwies sich als zweckmäßig, feste Verdünnungsstufen zu etablieren (für unser Patientengut und unsere Rezeptor-

konzentrationen waren dies: unverdünnt, 1:6, 1:21, 1:71). Dazu wurde bei gleichen AChR- und Patientenserumkonzentrationen der Test mit steigenden Mengen des Kaninchen-Anti-Human-IgG-Serums durchgeführt. Diejenige Menge Antiserum, die am meisten Radioaktivität präzipitierte, wurde als optimal definiert und im Routine-test verwendet. Sie betrug bei Verwendung des Kaninchen-Anti-Human-IgG-Serums von Behring im Mittel bei unverdünnten Seren 120 μ l, bei den Verdünnungsstufen 1:6 60 μ l, 1:21 40 μ l und bei 1:71 30 μ l des sekundären Ak.

6.2.2. Präzisionskontrolle

In jedem Test wurden zur Qualitätskontrolle Standardseren mit niedriger, mittlerer bzw. hoher Ak-Konzentration mitgeführt und als Negativkontrolle ein Normalserum bestimmt. Die Interassay-Varianz (n=45) lag bei 7.5 % für hohe Ak-Konzentrationen ($\bar{x}$ = 100 nmol/l) und 12.6 % für niedrige Ak-Konzentrationen ($\bar{x}$ = 8.5 nmol/l). Der Varianzkoeffizient der Intraassay-Varianz (n=10) betrug bei verschiedenen Konzentrationen um 5 %.

6.2.3. Störeinflüsse

Eine Beeinflussung durch Antikoagulantien, Rheumafaktor, hohe Bilirubin-Konzentration und Hämolyse konnte nicht festgestellt werden. Eine 7-tägige Lagerung der Serumproben bei Zimmertemperatur hatte praktisch keinen Einfluß auf die Titerhöhe. Deshalb ist ein Postversand der Proben in ungekühltem Zustand möglich. Die Proben konnten jahrelang bei -20°C ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden, bei 4°C jedoch nur 3 Wochen. Ein dreimaliges Einfrieren und Auftauen beeinflussten die Werte nicht.

6.2.4. Referenzbereich

An 37 klinisch und laborchemisch gesunden Personen, 67 Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen und 31 Patienten mit anderen neuromuskulären Erkrankungen wurde die obere Referenzbereichsgrenze mit 0.4 nmol/l festgelegt (Abb. 4). Der Medianwert betrug bei gesunden Probanden 0.13 nmol/l , beim Gesamtkollektiv der Kontrollpersonen 0.11 mit einer 98 Perzentile von 0.35 bzw. 0.37 nmol/l . Bei keinem der Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen wurde die obere Referenzbereichsgrenze überschritten.

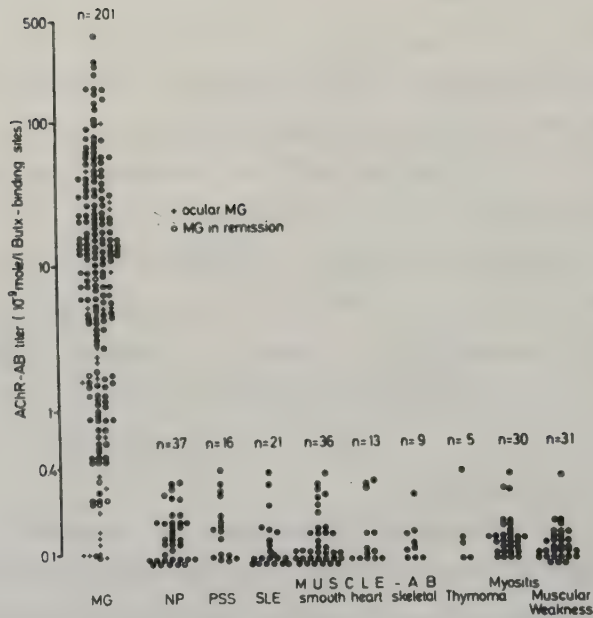


Abb. 4: Antikörper gegen AChR im Serum von Patienten mit MG und Patienten mit Autoimmunerkrankungen (Progressive systemische Sklerose PSS, systemischer Lupus erythematoses SLE, Myositis), Patienten mit Thymomen ohne MG, Patienten mit anderen neuromuskulären Erkrankungen, sowie Patienten ohne MG mit Antikörpern gegen Muskelgewebe (glatte, quergestreifte und cardiale Muskulatur).

6.2.5. Antikörper gegen AChR

Seren von 201 Patienten mit gesicherter MG (169 generalisiert, 27 okulär) wurden im Immunpräzipitationsassay gemessen. Positive Titer, d.h. AChR-Ak-Werte über der oberen Referenzbereichsgrenze von 0.4 nmol/l fanden sich bei 163 (96 %) der generalisierten und 17 (63 %) der okulär erkrankten Patienten (Abb. 4). Von 5 Patienten in Remission ließen sich nur bei 2 pathologische Werte nachweisen. Die gemessenen Ak-Konzentrationen lagen zwischen etwa 0.2 und 500 nmol/l Serum. 4 % der generalisierten und 37 % der okulären Myastheniker hatten einen Ak-Titer unterhalb der Referenzbereichsgrenze und wurden als negativ gewertet. Anders als von Lefvert et al. (1978) beschrieben, ließen sich bei Patienten mit niedrigen bis grenzwertigen IgG-Ak-Titern und bei Neuerkrankten durch Zugabe von Anti-IgM bzw. Anti-IgA-Ak als sekundärer präzipitierender Ak in keinem Falle Anti-AChR-Ak der IgM oder IgA-Klasse nachweisen (33).

6.2.6. Diagnostische Zuverlässigkeit

Aus den erhobenen Testergebnissen wurden die für die diagnostische Zuverlässigkeit eines klinisch-chemischen Befundes maßgebenden Größen wie diagnostische Spezifität, diagnostische Empfindlichkeit, positiver Predictive Value und negativer Predictive Value

berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 zusammengestellt. Die Zahlenwerte für die diagnostische Spezifität und Empfindlichkeit zeigen, daß der Immunpräzipitationstest ein sehr empfindliches

	AChR-AB ⊕	AChR-AB ⊖	
gen. MG	163	6	diagn. sensitivity 0.96
non MG	0	61	specificity 1.0
	pv+ 1	pv- 0.91	
ocul. MG	17	10	diagn. sensitivity 0.63
non MG	0	61	specificity 1.0
	pv+ 1	pv- 0.86	

Abb. 5: Diagnostische Empfindlichkeit, Spezifität und Predictive Value eines positiven (pv+) oder negativen (pv-) Ak-Tests für Patienten mit generalisierter und okulärer MG. Die Gruppe ohne MG wurde nur aus Patienten mit verschiedenen neuromuskulären Krankheiten gebildet.

und spezifisches Verfahren in der MG-Diagnostik darstellt. Die diagnostische Empfindlichkeit ist bei der rein okulären Verlaufsform erheblich geringer als bei der generalisierten.

Der positive Predictive Value von 1 besagt, daß bei einem positiven Testergebnis mit 100 %iger Wahrscheinlichkeit auf eine Erkrankung (generalisiert bzw. okulär) geschlossen werden kann.

Der negative Predictive Value von 0.91 bei der generalisierten bzw. 0.86 bei der okulären Form der Myasthenie besagt jedoch, daß bei negativem Testergebnis eine MG nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 91 bzw. 86 % ausgeschlossen werden kann. Diese Zahlen hängen jedoch auch von der Prävalenz der Erkrankung im untersuchten Kollektiv und somit von der speziellen Ausbildung der untersuchten Neurologen ab.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, bei einem positiven Testergebnis einen Nicht-MG-Kranken als MG-Kranken einzuordnen.

6.2.7. Alter und Geschlecht

122 unserer Patienten waren Frauen, 79 Männer. Die Geschlechterverteilung weiblich zu männlich beträgt somit 3:2 und entspricht etwa dem von Ossermann (44) festgestellten Quotienten.

Bei Frauen lag der Manifestationsgipfel zwischen 21 bis 40, bei Männern zwischen 41 und 60 Jahren. 51.4 % der Frauen waren jünger

als 40 Jahre, jedoch nur 22.3 % der Männer. Somit besteht eindeutig eine Prädisposition für Frauen unter 40 Jahren wie bei einer Vielzahl von anderen Autoimmunerkrankungen.

AChR-Ak-Konzentrationen waren bei weiblichen Patienten im Mittel höher als bei Männern, wobei die Patientinnen jünger als 40 Jahre höhere Titer aufwiesen, wie aus dem Vergleich der Medianwerte und 90 % Perzentile ersichtlich war. Eine Korrelation zwischen Alter und AChR-Ak-Titer ließ sich allerdings statistisch nicht sichern.

6.3. Korrelation zwischen AChR-Ak-Titer und klinischem Schweregrad

6.3.1. Interindividuell

Zwischen Ak-Konzentration und standardisiert quantitativ erfaßtem klinischen Schweregrad der Erkrankung bei verschiedenen Patienten ließ sich eine statistisch gesicherte Beziehung nicht herstellen. Ak-Titer von okulären Myasthenikern lagen im Mittel niedriger, was aber für den Einzelfall ohne Bedeutung war.

6.3.2. Intraindividuell

6.3.2.1. Verlaufstudie

Bei 28 von 50 Patienten fiel der AChR-Ak-Titer im beobachteten Zeitraum ab. 19 Patienten davon waren klinisch gebessert, 9 unverändert und keiner verschlechtert. Ein Titeranstieg war bei 7 der 50 Patienten zu beobachten. Davon waren 2 klinisch verschlechtert, 4 unverändert, eine Patientin verbesserte sich. Im Verlauf konstante Titer zeigten 15 von 50 Patienten, davon waren 11 auch klinisch unverändert, 4 zeigten geringgradige klinische Veränderungen (3 gebessert, 1 verschlechtert).

Zur weiteren Analyse kurzfristiger Veränderungen von Ak-Titer und MS-Score wurde der Beobachtungszeitraum in kurze Intervalle von ca. 2 Monaten Dauer unterteilt. Insgesamt wurden 181 Einzelphasen untersucht. Es fand sich eine hochsignifikante intraindividuelle Korrelation zwischen klinischen Veränderungen und Titerbewegungen bei bivariater Analyse ($r_{biv} = 0.47$, $p < 0.001$; Abb. 6). In einzelnen Patienten war diese Korrelation nicht streng linear (Abb. 7).

Vereinzelte wurden auch Dissoziationen zwischen klinischem Verlauf und Ak-Titerveränderungen beobachtet: dreimal kam es zu einer klinischen Verschlechterung trotz Titerabnahme, dreimal zu einer klinischen Besserung trotz Titeranstiegs (Abb. 8). Eine klinische

Verschlechterung bzw. Verbesserung bei nicht sicher verändertem Ak-Titer fanden sich in 11 bzw. 7 Einzelphasen. Auch beim einzelnen Patienten ließen sich Phasen mit guter Korrelation von Ak-Titer und klinischem Score von gegenläufigen Bewegungen abgrenzen (Abb.9). Bemerkenswert war, daß Titerveränderungen häufiger den klinischen Veränderungen um 3 Wochen bis 3 Monate vorausgingen (Abb. 7).

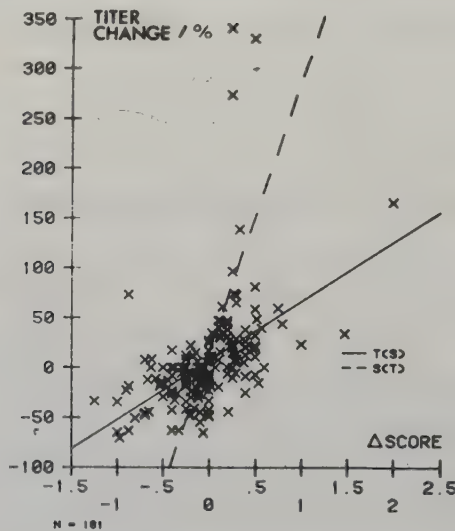


Abb. 6: Korrelation von Ak-Titerbewegungen und klinischen Veränderungen. S = Score, T = Titer. S(T) bezeichnet die univariate Analyse von Scoreveränderungen (S) als lineare Funktion von Titerveränderungen (T) und T(S) die umgekehrte Funktion. Durchgezogene Linie = Regressionslinie von T(S), durchbrochene Linie = Regressionslinie von S(T).

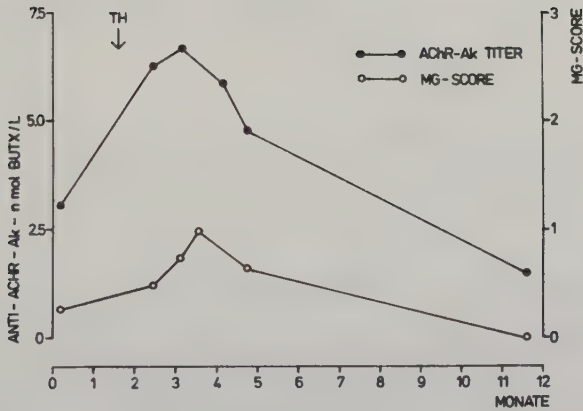


Abb. 7: Gute Korrelation im Verlauf zwischen Ak-Titer und klinischem Score bei einem Patienten mit leichter generalisierter MG. TH bezeichnet den Zeitpunkt der Thymektomie.

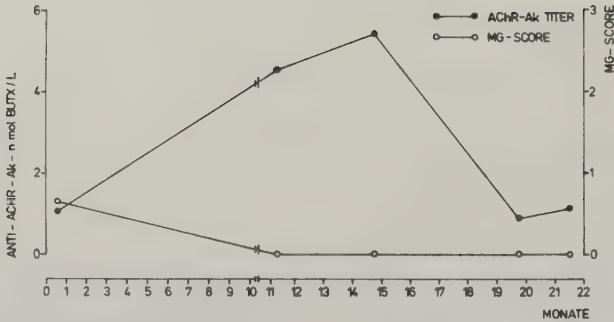


Abb. 8: Gegenläufige Bewegung von AK-Titer und klinischem Score bei einem Patienten mit leichter generalisierter MG.

6.3.2.2. Unter Plasmaaustauschbehandlung

Bei 6 Patienten mit schwerer Verlaufsform der MG mußten insgesamt 50 Plasmaaustauschbehandlungen durchgeführt werden. Dabei zeigte sich, daß die PE eine sehr effiziente Methode darstellt, um kurzfristige klinische Verbesserungen und Ak-Titerabfälle zu induzieren (Abb. 10). Abhängig vom Austauschvolumen, konnten die Ak-Titer reproduzierbar gesenkt werden. 6 - 36 Stunden nach dem ersten Austausch konnten bei den meisten Patienten die ersten klinischen Besserungen beobachtet werden. Lediglich bei 2 Patienten mit seit

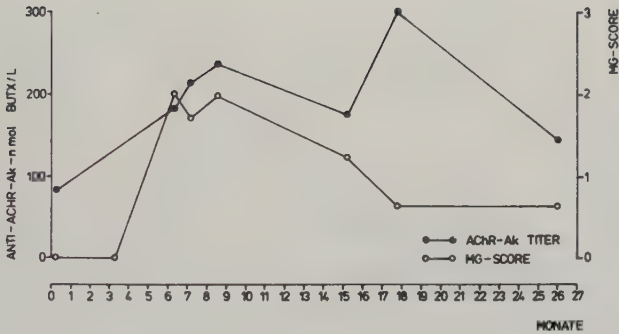


Abb. 9: Gute Korrelation zwischen Ak-Titer und klinischem Score in der ersten Phase des Beobachtungszeitraums, aber nicht während einer späteren Krankheitsphase.

langem bestehender schwerer MG kam es nur zu einer verzögerten Erholung nach mehreren PE, verbunden mit erhöhter immunsuppressiver Medikation. Die Kinetik des Ak-Wiederanstiegs variierte erheblich von Patient zu Patient und korrelierte überwiegend invers mit der Dosis der Immunsuppressiva. Im schwersten Fall betrug die

Verlauf des AChR-AK Titors und des klin. Befundes bei einem Patienten (L M 9 21 J) mit M G

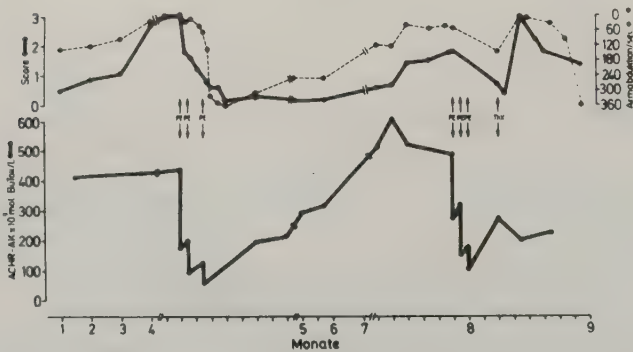


Abb. 10: Verlauf des AChR-Ak-Titers, des klinischen Score und der Armhaltezeit bei einem Patienten mit MG unter Plasmaaustauschtherapie. PE = Plasmaaustausch, ThX = Thymektomie.

Halbwertszeit des Wiederanstiegs 1.8 Tage. Neben der Umverteilung aus dem Gewebepool scheint der Ak-Wiederanstieg daher wenigstens teilweise durch Neusynthese verursacht zu sein. In manchen Patienten stiegen die spezifischen Ak-Titer schneller als das Gesamt-IgG, was für eine Aktivierung des autoimmunologischen Prozesses spricht, in anderen Patienten konnten gegenteilige Effekte beobachtet werden.

6.4. Adsorptionschromatographische Reinigung der Anti-AChR-Ak

Zur Reinigung der spezifischen Anti-AChR-Ak aus dem polyklonalen Gesamt-IgG eines Patienten mit MG wurde durch Bindung von humanen AChR an α -Butx-Sepharose 4B ein Immunoadsorbens-Gel hergestellt. Die Ergebnisse der insgesamt 6 Aufarbeitungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Durch Proteinbestimmung aus dem Filtrat des 1. Inkubationsschritts ergab sich, daß α -Butx zu 85 - 95 % kovalent an der CH-aktivierten Sepharose 4B gebunden wurde, was einer mittleren Konzentration von ca. 0.25 mg α -Butx/ml Gel entsprach. Diese Gele adsorbierten aus den rohen Muskelextrakten mit einer Ausgangskonzentration von 0.6 - 1.8 pmol/ml AChR zwischen 50 - 70 % der Rezeptormoleküle. Um einer möglichen AChR-Freisetzung bei den folgenden drastischen Elutionsbedingungen und somit einer Verunreinigung der Anti-AChR-Ak vorzubeugen, wurden die Rezeptoren mittels des bifunktionellen quervernetzenden Reagens Glutardialdehyd (GA) kovalent an die Säule gebunden. In Vorversuchen erwies sich eine 10-minütige Inkubation mit 0.1 % GA bei 4°C als optimal. Bei höheren GA-Konzentrationen und längeren Inkubationszeiten kam es zu einem zunehmenden Verlust antigener Strukturen. Niedrigere GA-Konzentrationen hatten bei der Ak-Elution die Desorption geringer Mengen von AChR oder AChR-Fragmenten zur Folge, was durch Zugabe von ^{125}J - α -Butx zum Eluat und Ausfällung der gebildeten

Aufar- beitung	Butx		AChR		AChR-Ak		AChR-Ak : Gesamt-IgG	Reinigungs- faktor
	eingesetzt	gebunden (Ausbeute)	eingesetzt	gebunden (Ausbeute)	eingesetzt	gebunden (%theoret.Ausbeute)		
1	2 mg = 250 nmol	225 nmol (90 %)	1,2 nmol	0,7 nmol (58 %)	6 nmol	0,61 nmol (87 %)	1 : 100	8
2	1 mg = 125 nmol	106 nmol (85 %)	0,9 nmol	0,55 nmol (61 %)	5 nmol	0,45 (82 %)	1 : 4	200
3	3 mg = 375 nmol	345 nmol (92 %)	1,3 nmol	0,8 nmol (61 %)	6 nmol	0,6 (75 %)	1 : 20	40
4	1 mg	111 nmol (89 %)	1,2 nmol	0,64 (53 %)	6 nmol	0,57 (89 %)	1 : 10	80
5	1 mg	109 nmol (87 %)	0,8 nmol	0,54 (68 %)	5 nmol	0,38 (71 %)	1 : 4	200
6	1 mg	117 nmol (94 %)	1 nmol	0,52 (52 %)	5 nmol	0,45 (87 %)	1 : 8	100

Tab. 2: Ausbeuten der 6 adsorptionschromatographischen Aufreinigungen der spezifischen Anti-AChR-Ak. Der Faktor der Aufreinigung wurde berechnet unter Berücksichtigung eines Verhältnisses von Gesamt-IgG : AChR-Ak von 800 : 1 im Ausgangs-IgG.

Butx-AChR-Ak-Komplexe mittels Anti-Human-IgG nachgewiesen werden konnte.

Dieses Immunadsorptionsgel wurde in einem molaren Überschuß von 5:1 (auto-Ak:AChR) mit gereinigtem IgG aus dem Serum eines Patienten mit MG inkubiert. Dabei wurde 70 - 90 % der theoretisch zu erwartenden Ak-Menge abgebunden, was einer weitgehenden Erhaltung der Antigenität der Rezeptormoleküle entspricht.

Die Desorption der Anti-AChR-Ak wurde mit 3 M NaSCN (Inkubationszeit 10 min) oder 4 M NaCl (30 min) erreicht mit einer Wiederfindung von 50 - 60 % der adsorbierten Ak bei NaSCN bzw. 40 % bei NaCl. Von eminenter Bedeutung für die Reinheit der eluierten spezifischen Ak waren die 2 Waschschrirte mit 1 M NaCl, der Eine nach der Inkubation der α -Butx-Sepharose mit dem Muskelextrakt, der Andere nach der Inkubation des Gesamt-IgG mit dem AChR-Gel, wobei unspezifisch an das Gel adsorbierte, möglicherweise als Antigen wirksame Makromoleküle bzw. nicht gegen AChR gerichtete Ak entfernt wurden.

Die Elutionsbedingungen zerstörten größtenteils die antigenen Strukturen der kovalent gebundenen AChR, so daß bei einer erneuten Inkubation des Gels mit Myastheniker-IgG nur noch 10 % der Erstmenge an Anti-AChR-Ak gewonnen werden konnte. Überdies waren diese Präparationen stärker mit polyklonalem IgG verunreinigt, was bei identischen Aufarbeitungsbedingungen durch veränderte antigene Strukturen der AChR mit folgender Begünstigung unspezifischer

Ak-Antigen-Wechselwirkungen zu erklären ist. Aus diesen Gründen waren die Immunadsorptionsgele nicht regenerierbar.

Durch Vergleich der im Immunpräzipitationsassay erhaltenen AChR-Ak-Titer mit den in der radialen Immundiffusion gemessenen Gesamt-IgG-Konzentrationen wurde ein Kriterium für die Reinheit der spezifischen Ak-Präparationen erhalten. Verhältniszahlen von 1:4 für die besten Proben bis 1:100 für den schlechtesten Versuch wurden bestimmt. Der Gesamtgehalt an spezifischem IgG schwankte vor Dialyse und Konzentrierung zwischen 30 und 50 μg pro Aufarbeitung. Bei der abschließenden Konzentrierung gingen noch bis 50 % der AChR-Ak durch Adsorption an die Membran verloren, so daß letztendlich je Aufarbeitung 15 bis 30 μg AChR-Ak gereinigt vorlagen.

7. DISKUSSION

7.1. Der Immunpräzipitationsassay und seine Anwendung in der Diagnostik der MG

In Anlehnung an den von Lindstrom et al. (36) beschriebenen Immunpräzipitationsassay, dessen Prinzip darin besteht, mit ^{125}J -a-Butx spezifisch markierte AChR mit autoimmunen Ak zu inkubieren, und die gebildeten Komplexe mit Anti-human-IgG auszufällen, wurde eine vereinfachte Modifikation entwickelt (24, 61). Dabei wurde der Leerwert nicht für jede Probe einzeln mit Serum und Benzoquilonium oder kaltem Butx ausgetestet, sondern pro Testansatz für alle Seren gemeinsam ohne Zugabe von Serum bestimmt. Darüber hinaus wurden die Seren zur Einsparung von Anti-Human-IgG mit PBS anstatt Normalserum verdünnt.

Bei 96 % der Patienten mit klinisch gesicherter generalisierter MG und bei 63 % der Patienten mit okulärer Verlaufsform fanden sich Antikörperkonzentrationen gegen AChR, die eindeutig über dem, an einem Kontrollkollektiv ermittelten Referenzbereich lagen. Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen, mit positivem Muskelantikörpernachweis im Immunfluoreszenztest und mit anderen neuromuskulären Krankheiten zeigten im Referenzbereich liegende AChR-Ak-Konzentrationen. Die diagnostische Empfindlichkeit und Spezi-

fität, wie auch der Predictive Value für einen positiven Test waren sehr hoch. Einschränkend ist allerdings anzumerken, daß das untersuchte Patientenkollektiv vorselektioniert war, aus Spezialambulanzen stammte und somit die Prävalenz der Erkrankung hoch war, was die diagnostische Aussagekraft des Tests erhöhte. Insgesamt zeichnet sich die hier beschriebene Methode der AChR-Ak-Bestimmung als eine einfache, routinemäßig anwendbare, empfindliche und spezifische Methode zur Diagnostik der MG aus, mit einer zu anderen RIA's vergleichbaren methodischen Präzision.

Es ist eine Vielzahl von Immunpräzipitationsassays beschrieben worden, die alle auf dem oben genannten Prinzip beruhen. Im Vergleich der verschiedenen Tests zeigt sich (Tab. 3), daß die hohe diagnostische Empfindlichkeit unabhängig vom Reinigungsaufwand für den menschlichen Rezeptor ist. Aus der Tabelle ergibt sich auch, daß Extrakte aus denerviertem Rattenmuskel zum Nachweis von humanen AChR-Ak wenig geeignet sind, was weniger auf eine geringe Kreuzreaktivität zwischen humanen Ak und extrajunktionalem Rattenrezeptor, sondern vor allem auf den sehr hohen Background durch unspezifische Bindung von normalen Ak an Rattenrezeptor zurückzuführen ist (7).

Die Bestimmung eines "blockierenden" Ak, der den AChR an der Butx-Bindungsstelle angreift, wie sie zuerst von Almon und Appel beschrieben wurde (1), erfaßt eine andere Ak-Population als der

AUTOR	Pat.-Zahl	Referenzbereich (nmol/l) ⁺	Sensitivität MG gesamt	general.	okulär	Methode
Almon & Appel (1976)	25	(0,05) [*]	68 %	-	-	Butx-blockierender Ak
Brenner et al. (1978)	69	5,5	37 %	41 %	0 %	Rezeptor-Extrakt aus denerv. Rattenmuskel
de Crousaz et al. (1978)	30	0	83 %	95 %	0 (N=1)	über 2-fache Säulenchromatographie gereinigter menschlicher Rezeptor
Kalies et al. (1979)	75	0	80 %	85 %	69 %	entsprechend de Crousaz et al.
Leffert et al. (1978)	175 § 76 §§	(0,2) ⁺⁺	91 % 75 %	93 % 75 %	71 % 71 %	nach Markierung über einfache Säulenchromatogr. gereinigter menschl. Rez.
Lindstrom et al. (1976)	71	0,62	87 %	90 %	71 %	ungereinigter menschlicher Rezeptor, Leerwert mit Benzoquinon + Serum
Grindall (1981)	180	0,4	66 %	68 %	55 %	analog zu Lindstrom et al.
Vincent et al. (1979)	73	0,2	89 %	95 %	71 %	ungereinigter menschlicher Rezeptor, Leerwert mit kaltem Butx + Serum

Tab. 3: Vergleich der diagnostischen Empfindlichkeit der von verschiedenen Arbeitsgruppen beschriebenen Immunpräzipitationsassays.

+ = Butx-Bindungsstellen
 § = schwedische Patientengruppe §§ = finnische Patientengruppe
 * = Radioaktivität Pellet : Radioaktivität Überstand ++ = willkürliche Einheit

Immunpräzipitationsassay und kann deshalb als ergänzende Untersuchung vor allem bei im Präzipitationsassay negativen Patienten sinnvoll sein. In der Praxis der MG-Diagnostik hat sich dieser Test bei einer Sensitivität von 68 % aber nicht durchgesetzt. Desgleichen erbringen Verlaufskontrollen mit diesem Test keine zusätzlichen patientenrelevanten Informationen (5).

Die geringere Empfindlichkeit des Immunpräzipitationsassay bei rein okulärer Manifestation der Krankheit kann verschiedene Ursachen haben:

1. Unterschiedliche Antigenität von Beinmuskel-AChR und extraokulärem AChR und daraus folgende niedrige Kreuzreaktivität zwischen okulären Ak und Beinmuskel-AChR (65).
2. Unterschiedliche Spezifität des polyklonalen Ak-Spektrums (65).
3. Erniedrigte Sicherheitsbreite für okuläre Transmission, die von Ak-Konzentrationen durchbrochen werden kann, die unterhalb des Referenzbereichs liegen (67).
4. Okuläre Muskeln bestehen zu etwa 20 % aus langsamen Fasern. Diese reagieren auf einen Nervenreiz nicht nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, sondern graduiert. Jede Abnahme einer Transmitter-induzierten Depolarisation könnte daher zu einer abgeschwächten Reizantwort führen (50).

Der fehlende Ak-Nachweis bei 4 % der Patienten mit generalisierter MG kann folgendermaßen erklärt werden:

1. Es sind Ak vorhanden, die mit diesem Testsystem nicht erfaßt werden. So konnte bei einem Patienten mit grenzwertiger Ak-Konzentration im Immunpräzipitationsassay eine eindeutige Ak-Aktivität im Bioassay an der Maus gezeigt werden (60).
2. Es könnte sich um Sonderformen der MG handeln, bei denen den humoralen Ak keine pathogenetische Bedeutung zukommt. Dafür könnte sprechen, daß bei der kongenitalen MG bisher bei keinem Patienten humorale Ak gemessen wurden (66).
3. Die Bindung der Ak an den AChR liegt im Bereich der α -Butx-Bindungsstelle. Mit dem beschriebenen Radioimmunoassay können nämlich lediglich Ak erfaßt werden, die nicht gegen die α -Butx-Bindungsstelle gerichtet sind (14).

Bei keinem der Patienten aus den Kontrollkollektiven fanden sich über dem Referenzbereich liegende AChR-Ak-Titer. Andere Arbeitsgruppen konnten dagegen bei verschiedenen nicht-myasthenischen Patientenkollektiven AChR-Ak feststellen. So wurden niedrige AChR-Ak-Titer ohne klinische Anhalte einer MG berichtet bei 3 Fällen von Thymom (11), bei 6 von 47 Patienten, die wegen einer rheumatischen Arthritis mit Penicillamin behandelt wurden (68), bei 23 Patienten mit tardiver Dyskinesie (6), bei asymptomatischen Ver-

wandten von MG-Patienten (47), bei 2 Patienten mit einem Morvan-Syndrom (25) und bei 3 von 40 Patienten mit hoch positiven Thyroid-Autoantikörpern (49). Verschiedene Faktoren können zu diesen Befunden beigetragen haben: ein (noch) subklinischer Defekt der neuromuskulären Transmission kann vorgelegen haben, die AChR-Ak können niedrigaffin gewesen sein, oder von einer nicht pathogenen Spezifität, oder andere Störungen am AChR induziert haben (im Falle der tardiven Dyskinesie und des Morvan-Syndroms).

Die im Immunpräzipitationsassay gemessenen Ak-Konzentrationen korrelieren interindividuell nur schwach mit dem Ausmaß der myasthenen Muskelschwäche. Folgende Mechanismen könnten dafür verantwortlich sein:

1. Die im Test verwendeten AChR sind durch die Detergentienbehandlung aus ihrem Membranverband herausgelöst, in den sie in vivo integriert sind. Dadurch können zusätzliche Bindungsstellen oder solche mit anderer Affinität für den Ak exponiert werden (10).
2. Bei einzelnen Patienten können Ak mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften vorliegen. So lassen sich mit verschiedenen in vitro-Methoden neben Ak im Immunpräzipitationsassay gleichzeitig "blockierende", an der ACh-Bindungsstelle angreifende, und Concanavalin A-bindende Ak nachweisen (41). Welche pathogenetische Wertigkeit den einzelnen Ak-Populationen zukommt, ist da-

bei ungeklärt.

3. Ein wesentlicher, interindividuell unterschiedlich großer Teil der AChR-Ak läßt sich nicht mit heterologen Muskelextrakten, sondern nur mit dem autologen, also patienteneigenen AChR nachweisen (35).

4. Die Bindung von Ak an AChR in vivo muß nicht unmittelbar mit einer irreversiblen Funktionsstörung (Blockade oder Elimination) der AChR und damit einer klinisch und elektrophysiologisch faßbaren Einschränkung der neuromuskulären Übertragung einhergehen. Erst in einem zweiten Schritt wird wahrscheinlich über eine Aktivierung der Komplementkaskade mit Lyse von Membransegmenten (18) oder eine Beschleunigung des AChR-Abbaus bei gleichbleibender Syntheserate (27) ein AChR-Verlust eingeleitet. Dieser Schritt könnte seinerseits interindividuellen Schwankungen unterworfen sein.

5. Eine erhöhte Resynthese von AChR an der Endplatte könnte in individuell unterschiedlichem Ausmaß den Ak-induzierten AChR-Verlust zumindest teilweise kompensieren (70).

Der Immunpräzipitationsassay hat sich zweifellos als wichtiges Hilfsmittel in der Diagnosestellung der MG bewährt. Durch ihn wurde die Diagnostik vor allem bei atypischen und nicht eindeutigen Fällen von MG wesentlich sicherer gemacht.

Es wurde von verschiedenen Gruppen versucht, das Nachweisprinzip

mit radioaktiven Isotopen mit seinen strahlenschutztechnischen Risiken und Problemen durch Nachweisverfahren mit Verwendung Enzym-gekoppelter sekundärer Antikörper (ELISA) zu ersetzen. Diese Technik erfordert aber in der Regel die Reindarstellung des Antigens, was ihre routinemässige Anwendung bisher verhindert hat. Deshalb gab es neben Versuchen mit hochgereinigten AChR aus humanen (30), kälberfetalen (28) und denervierten Rattenmuskeln (21) auch experimentelle Ansätze, wobei das Antigen, der AChR, über monoklonale Anti-AChR-Ak (15) an die Matrix adsorbiert und anschließend die Autoimmunreaktion nachgewiesen wurde.

Ein interessanter Ansatz für wissenschaftliche Fragestellungen ergibt sich aus der Verwendung von monoklonalen humanen antiidiotypischen Ak, mit denen die Analyse distinkter Ak-Klone aus dem polyklonalen Ak-Spektrum möglich wäre. Dabei besteht die Hoffnung, pathogen relevante von nicht relevanten Klonen differenzieren zu können und damit zu einer besseren interindividuellen Korrelation der Ak-Titer zum Schweregrad der Krankheit zu gelangen.

7.2. Verlaufsstudien bei Patienten mit MG

Die Verlaufsstudie zeigte eine signifikante Korrelation zwischen den kurzfristigen Ak-Titerveränderungen und den Veränderungen des klinischen Befundes (3, 4, 5). Die Befunde bestätigten frühere

Untersuchungen an kleineren Patientenkollektiven unter Plasmaaustauschtherapie (42), Azathioprinbehandlung (48) oder Steroidtherapie (54) und wurden durch weitere Untersuchungen gestützt (43, 58, 67).

Als Erklärung für eine mangelhafte Korrelation und zum Teil sogar gegenläufige Bewegung des klinischen Befunds im Vergleich zu Ak-Titerveränderungen können folgende Mechanismen in Frage kommen:

1. Heterogene (polyklonale) Ak-Zusammensetzung, wobei mit dem hier verwendeten Assay nur eine Ak-Klasse gemessen wird (41).
2. Zeitverlauf der Rezeptordegradierung mit und ohne Komplementeinfluß als verzögernde Komponente nach Titeranstieg (19).
3. Unterschiedliches Ausmaß der Rezeptorresynthese zu verschiedenen Zeiten als zusätzliches Regulativ (70).
4. Labiles Gleichgewicht im Grenzbereich der Sicherheitszone der neuromuskulären Transmission.
5. Einflüsse der Veränderung der Endplattengeometrie (51).
6. Nicht-immunologische Mechanismen, z.B. hormonelle Einflüsse an der motorischen Endplatte (13).

Alle diese Einzelfaktoren können intra- und interindividuell innerhalb des Krankheitsverlaufs eine ganz unterschiedliche Gewichtung erfahren.

In der praktischen Anwendung hat es sich bewährt, einen ansteigenden Titer als Zeichen steigender immunpathologischer Aktivität aufzufassen, und auch bei unverändertem klinischen Befund

engmaschige Kontrollen durchzuführen, bzw. eine laufende immunsuppressive Therapie nicht zu reduzieren, bis in einer weiteren Überwachungsphase der klinische Verlauf sicher beurteilbar ist (5).

7.3. Affinitätschromatographische Reinigung spezifischer Anti-AChR-Antikörper

Mit einem Immunoadsorbens aus humanem AChR, gekoppelt an a-Butx-Sepharose 4B wurden Anti-AChR-Ak aus dem polyklonalen IgG eines Patienten mit MG gereinigt. Dieses Verfahren, a-Butx, das in Milligramm-Mengen kommerziell zur Verfügung steht, als spezifisches Adsorbens für AChR zu benutzen, und somit an das Gel zu binden, umgeht die Probleme einer Reinigung von genügend AChR aus rohen menschlichen Muskelextrakten für die direkte Kopplungsreaktion. Einen ähnlichen Weg waren Schwartz et al. (53) gegangen, als sie Anti-AChR-Ak aus dem Serum von gegen Torpedo AChR immunisierten Kaninchen reinigten. Andererseits war es Lindstrom et al. gelungen (38), Anti-Torpedo-AChR-Ak aus der Ziege durch affinitätschromatographische Reinigung über das hochgereinigte Antigen darzustellen, ein Weg der wegen der leichten Verfügbarkeit des Fisch-Rezeptors gangbar war. Levfert et al. (34) hatten eine mit AChR-Bruchstücken verunreinigte angereicherte Anti-AChR-Ak-Fraktion erhalten, nachdem sie den Komplex aus gereinigtem humanen AChR

und Ak zuerst über ein Molekularsieb von dem restlichen polyklonalen IgG abtrennten, und den Komplex dann mit chaotropen Substanzen spalteten. Schließlich war es auch Lang et al. (31) zeitgleich zu uns in einem ähnlichen Verfahren gelungen, gereinigte humane AChR-Ak darzustellen, wobei aber höhere Aufreinigungen erst nach wiederholten Reinigungsschritten erreicht wurden.

Sämtliche Inkubationsschritte wurden im Batch-Verfahren durchgeführt. Die Reaktionen konnten dadurch sterisch ungehindert ablaufen, ungünstige Volumenverhältnisse (z.B. 1 l Muskelextrakt auf 15 ml Gel) wurden ausgeglichen, und damit längere Kontaktzeiten zwischen den Reaktionspartnern ermöglicht, und ein mechanischer Einschluß größerer Membranpartikel aus den Extrakten mit Einführung zusätzlicher antigener Strukturen vermieden.

Die Inkubation mit dem bifunktionalen Reagens Glutardialdehyd verknüpfte die AChR kovalent mit der Sepharose und sollte damit zum Einen ein Abdissoziieren von AChR oder -fragmenten während der Ak-Elution verhindern, zum Anderen die Rezeptorkonfiguration stabilisieren, um die Antigenizität trotz der drastischen Elutionsbedingungen zu erhalten. Leider war das Letztere nicht möglich, nur etwa 10 % der antigenen Strukturen konnten erhalten werden. Die Gele ließen sich somit nicht wiederverwenden.

Die verschiedenen Ak-Präparationen wiesen erhebliche Unterschiede in ihrem Gehalt an autoimmunen Ak auf. Bezogen auf das durch ra-

diale Immundiffusion ermittelte Gesamt-IgG und unter der Annahme eines 1:1:1 (Butx : AChR : Ak)-Komplexes im Präzipitationsassay ergaben sich Konzentrationsverhältnisse von 1:4 bis 1:100 zwischen Gesamt-IgG und anti-AChR-Ak.

Der Reinheitsgrad der Ak-Präparationen wird wesentlich von den beiden Waschschritten mit 1 M NaCl mitbeeinflusst. Dabei werden im einen Fall unspezifisch gebundene Muskelproteine entfernt, an die sich muskel-spezifische, nicht gegen AChR gerichtete Ak binden könnten, und im anderen Fall wird unspezifisch adsorbiertes IgG desorbiert.

Mit dem hier vorgestellten Verfahren konnten substantielle Mengen einer hoch angereicherten Anti-AChR-Ak-Fraktion hergestellt werden. Der Grad der Aufreinigung bezogen auf das Verhältnis Gesamt-IgG zu Ak-Titer betrug zwischen 8 und 200-fach. Auch wenn man bedenkt, daß während der Präparation durch die Waschschrritte niedrigaffine Anti-AChR-Ak verloren gegangen sein könnten, auch Ak gegen die Butx-Bindungsstelle nicht erfaßt werden, sollten sich damit wesentliche Komponenten der polyklonalen Anti-AChR-Ak-Population isolieren lassen, und diese dann der Charakterisierung zugänglich machen. Weitere Anwendungsmöglichkeiten eröffnen sich durch Immunisierung geeigneter Labortiere zur Herstellung von antiidiotypischen Ak zum Studium des immunregulativen Netzwerks und zur Entwicklung experimenteller Therapieformen.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Die klinischen Symptome der Myasthenia gravis (MG), Muskelschwäche und abnorme Ermüdbarkeit, beruhen auf einer Störung der neuromuskulären Übertragung. Die Ursache ist eine Verminderung der postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren (AChR) infolge eines immunpathologischen Angriffs autoimmuner anti-AChR-Antikörper. Bei 85 % der MG-Patienten konnten von Lindstrom et al. AChR-Ak im peripheren Blut gefunden werden.

Ziel dieser Arbeit war es, eine vereinfachte Modifikation des von Lindstrom et al. beschriebenen Immunpräzipitationsassays zu entwickeln, und auf seine Tauglichkeit in Diagnostik und Verlaufskontrolle der MG zu prüfen, des weiteren sollten spezifische AChR-Ak affinitätschromatographisch isoliert werden.

Das Prinzip des Immunpräzipitationsassay besteht darin, daß AChR, die mittels ^{125}J -a-Butx spezifisch radioaktiv markiert wurden, in einem ersten Reaktionsschritt an AChR-Ak gebunden werden, der entstehende Komplex mit Anti-Human-IgG präzipitiert und die ausgefällte Radioaktivität gezählt wird. Dieser Test wurde leicht modifiziert hinsichtlich der Bestimmung der Leerwerte und Verdünnung der Serumproben, womit erhebliche Einsparungen des se-

kundären Antikörpers möglich waren.

Der lineare Bereich mit konstanter Stöchiometrie von AChR und AChR-Ak (0-1.5 nmol/l) wurde anhand von Bindungskurven ermittelt, und der Meßbereich von 0 bis 1 nmol/l festgelegt. Die optimale Menge des sekundären Ak wurde ausgetestet. Die Interassay-Varianz betrug im Mittel 10 %, die Intraassay-Varianz war 5 %.

Seren von 201 Patienten mit gesicherter MG wurden gemessen. 96% der Patienten mit generalisierter und 63 % der Patienten mit okulärer MG zeigten Titer über der oberen Referenzbereichsgrenze von 0.4 nmol/l, die anhand eines Kontrollkollektivs mit Normalpersonen, Patienten mit Autoimmunerkrankungen und neuromuskulären Erkrankungen festgelegt wurde. Die diagnostische Empfindlichkeit (0,96 für generalisierte MG und 0,63 für okuläre MG) und Spezifität (1 für beide Verlaufsformen) waren sehr hoch, wie auch der Predictive Value von 1 für einen positiven Test.

Eine Korrelation zwischen Geschlecht, Alter und klinischem Schweregrad einerseits und AChR-Ak-Titer andererseits ließ sich nicht sichern.

Bei Verlaufsbeobachtungen an 50 Patienten ließ sich eine hochsignifikante intraindividuelle Korrelation zwischen klinischen Veränderungen und Titerbewegungen feststellen.

Zur affinitätschromatographischen Reinigung der AChR-Ak wurde der AChR über Butx an eine Gel-Matrix gebunden, der spezifische Ak damit inkubiert und die gebundenen Ak-Moleküle mittels chaotroper Substanzen eluiert.

Bei insgesamt 6 Aufarbeitungen wurden spezifische AChR-Ak Mengen im μg Bereich gewonnen mit einer bis zu 200-fachen Aufreinigung.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, daß der Immunpräzipitationsassay ein empfindlicher und spezifischer Test in der Diagnostik der MG ist, und sich bei guter Korrelation der Titerbewegungen zu klinischen Befundänderungen ausgezeichnet für die Verlaufskontrolle eignet.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Almon, R.R., Andrew, C.G., Appel, S.H.:
Serum globulin in myasthenia gravis: inhibition of alpha-bungarotoxin binding to acetylcholine receptors.
Science 186: 55-57, 1974
2. Becker, W., Rapp, W., Schwick, H.G., Störiko, K.:
Methoden zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen durch Immunpräzipitation.
Z Klin Chem Klin Biochem 6: 113, 1968
3. Besinger, U.A., Toyka, K.V., Fateh-Moghadam, A., Schumm, F., Heininger, K., Birnberger, K.L., Sandel, P., Hömberg, M. und Struppler, A.:
Die Bedeutung eines quantitativen klinischen Bewertungssystems für die Verlaufsbeurteilung der Myasthenia gravis: Eine prospektive Studie.
In: Mertens, H.G., Przuntek, H., eds. Pathologische Erregbarkeit des Nervensystems. Berlin: Springer Verlag, p. 568-572, 1980
4. Besinger, U.A., Toyka, K.V., Heininger, K., Fateh-Moghadam, A., Schumm, F., Sandel, P., Birnberger, K.L.:
Long-term correlation of clinical course and acetylcholine receptor antibody in patients with myasthenia gravis.
Ann NY Acad Sci 377: 812-815, 1981

5. Besinger, U.A., Toyka, K.V., Hömberg, M., Heininger, K.,
Hohlfeld, R., and Fateh-Moghadam, A.:
Myasthenia gravis: Long-term correlation of binding and bungaro-
toxin blocking antibodies against acetylcholine receptors with
changes in disease severity.
Neurology (Cleveland) 33: 1316-1321, 1983
6. Bradley, R.J., Dwyer, D.S., Kemp, G.E., and Crew, E.L.:
Antibodies against acetylcholine receptor in tardive dyskinesia.
Lancet i: 320-321, 1980
7. Brenner, T., Zweiman, B., Abramsky, O., Tarrab-Hazdai R.,
Lisak, R.P., and Fuchs, S.:
Radioimmunoassay of antibodies to acetylcholine receptor in
serum of myasthenia gravis patients.
Isr J Med Sci 14: 986-989, 1978
8. Büttner, J.:
Die Beurteilung des diagnostischen Wertes klinisch-chemischer
Untersuchungen.
J Clin Chem Clin Biochem 15: 1-12, 1977
9. Castleman, B.:
The pathology of the thymus gland in myasthenia gravis.
Ann NY Acad Sci 135: 496-503, 1966

10. Changeux, J.P., Benedetti, L., Bourgeois, J.P., Brisson, A., Cartaud, J., Devaud, P., Grünhagen, H., Moreau, M., Popot, J.L., Sobel, A., Weber, M.:
Some structural properties of the cholinergic receptor protein in its membrane environment relevant to its function as a pharmacological receptor.
Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 40: 211-230, 1976
11. Cuenoud, S., Feltkamp, T.E.W., Fulpius, B.E., and Oosterhuis, H.J.G.H.:
Antibodies to acetylcholine receptor in patients with thymoma but without myasthenia gravis.
Neurology (Minneapolis) 30: 201-203, 1980
12. Delwaide, P.J., Salomon, J., Van Cauwenberge, H.:
Premiers essais de traitement de la myasthenie par azathioprine.
Acta Neurol Belg 67: 701-710, 1967
13. Dudel, J., Birnberger, K.L., Toyka, K.V., Schlegel, C., Besinger, U.:
Effects of myasthenic immunoglobulins and of prednisolone on spontaneous miniature potentials in mouse diaphragms.
Exp Neurol 66: 365-380, 1979

- 14.Dwyer, D.S., Bradley, R.J., Oh, S.J., and Kemp, G.E.:
A modified assay for antibody against the nicotinic acetylcholine receptor in myasthenia gravis.
Clin exp Immunol 37: 448-451, 1979
- 15.Dwyer, D.S., Bradley, R.J., Urquhart, C.K., and Kearney, J.F.:
An enzyme-linked immunoadsorbent assay for measuring antibodies against muscle acetylcholine receptor.
J Immunol Meth 57: 111-119, 1983
- 16.de Crousaz, G., Fulpius, B., Monnier, V., Regli, F.:
Dosage des anticorps dirigés contre le récepteur nicotinique de l'acetylcholine: correlations clinicoimmunologiques chez 30 myasthéniques
Schweiz Med Wochenschr 108: 602-607, 1978
- 17.Engel, A.G. and Santa, T.:
Histometric analysis of the ultrastructure of the neuromuscular junction in myasthenia gravis and in the myasthenic syndrome.
Ann NY Acad Sci 183: 46, 1971
- 18.Engel, A.G., Lambert, E.H., Howard, F.M.:
Immune complexes (IgG and C3) at the motor endplate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization

and electrophysiologic correlations.

Mayo Clin Proc 52: 267-280, 1977

19. Engel, A.G., Sahashi, K., Lambert, E.H., and Howard, F.M.:

The ultrastructural localization of the acetylcholine receptor, immunoglobulin G and the third and ninth complement components at the motor endplate and implications for the pathogenesis of myasthenia gravis.

In: Aguayo, A.J., Karpatis, G., eds. Current topics in nerve and muscle research. Amsterdam: Excerpta Med (Int Congr Ser No 455), p. 111-122, 1979

20. Fambrough, D.M., Drachman, D.B., Satyamurti, S.:

Neuromuscular junction in myasthenia gravis: decreased acetylcholine receptors.

Science 182: 293-295, 1973

21. Furukawa, S., Akazawa, S., Furukawa, Y., Kamo, I., Satoyoshi, E., and Hayashi, K.:

A practical enzyme immunoassay for anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis.

J Neuroimmunol 6: 397-409, 1984

- 22.Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S.:

The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity.

Biochem J 89: 114-123, 1963

- 23.Grabar, P., Williams, C.A.:

Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochemique d'un mélange des proteines: application au serum sanguin.

Biochim Biophys Acta 10: 193, 1953

- 24.Heininger, K., Fateh-Moghadam, A., Toyka, K.V., Besinger, U.A., Witthöft, J.:

Significance of acetylcholine receptor antibody in the diagnosis and therapy monitoring of myasthenia gravis.

La Ricerca Clin Lab 10: 255-258, 1980

- 25.Hömberg, V., Halbach, M., Pause, M., Seitz, R.J., Toyka, K.V., Freund, H.-J., Wechsler, W.:

Morvan-Syndrom mit Thymom, Antikörpern gegen nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor und elektromyographischen Zeichen einer Neuromyotonie.

In: Gänshirt, H., Berlitz, P., Haack, G., eds. Kardiovaskuläre Erkrankungen und Nervensystem, Neurotoxikologie, Probleme des Hirntodes

Berlin: Springer Verlag, p. 851-856, 1985

26. Kalies, I., Kalden, J.R., Heinz, F., Janzen, R.W.Ch. and Lachenmayer, L.:

Nachweis von Acetylcholin-Rezeptor-Antikörpern im Serum von Myasthenia gravis Patienten unter Verwendung affinitätschromatographisch gereinigter humaner Acetylcholin-Rezeptor-Präparationen.

Klin Wochenschr 57: 875-881, 1979

27. Kao, I., Drachman, D.B.:

Myasthenic immunoglobulin accelerates acetylcholine receptor degradation.

Science 196: 527-529, 1977

28. Kawanami, S., Tsuji, R., and Oda, K.:

Enzyme-linked immunosorbent assay for antibody against the nicotinic acetylcholine receptor in human myasthenia gravis.

Ann Neurol 15: 195-200, 1984

29. Klett, R.P., Fulpius, B.W., Cooper, D., Smith, M., Reich, E., Possani, L.D.:

The acetylcholine receptor. I. Purification and characterization of a macromolecule isolated from *Electrophorus electricus*.

J Biol Chem 248: 6841-6853, 1973

30.Kohleisen, B., Kalies, J., Kalden, J.R.:

ELISA zum Nachweis von Acetylcholinrezeptor-Antikörpern im Serum von Myasthenia gravis Patienten

In: Jerusalem, F. (Hrsg.) Fortschritte der Myologie, Band VII, Freiburg, Deutsche Gesellschaft "Bekämpfung der Muskelkrankheiten" 147-153, 1984

31.Lang, B., Vincent, A. and Newsom-Davis, J.:

Purification of anti-acetylcholine receptor antibody from patients with myasthenia gravis.

J Immunol Meth 51: 371-381, 1982

32.Lee, C.Y.:

Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms.

Annu Rev Pharmacol 12: 265-286, 1972

33.Lefvert, A.K., Bergström, K., Matell, G., Osterman, P.O., Pirskanen R.:

Determination of acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis: Clinical usefulness and pathogenic implications.

J Neurol Neurosurg Psychiat 41: 394-403, 1978

34.Lefvert, A.K. and Bergström, K.:

Acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis: Purification and characterization.

Scand J Immunol 8: 525-534, 1978

35.Lefvert, A.K.:

Differences in the interaction of acetylcholine receptor antibodies with receptor from normal, denervated and myasthenic human muscle.

J Neurol Neurosurg Psychiat 45: 70-73, 1982

36.Lindstrom, J.M., Seybold, M.E., Lennon, V.A., Whittingham, S., and Duane, D.:

Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: prevalence, clinical correlates and diagnostic value.

Neurology (Minneap.) 26: 1054-1059, 1976

37.Lindstrom, J.M.:

An assay for antibodies to human acetylcholine receptor in serum from patients with myasthenia gravis.

Clin Immunol Immunopathol 7: 36-43, 1977

38.Lindstrom, J.M., Campbell, M. and Nave, B.:

Specificities of antibodies to acetylcholine receptors.

Muscle & Nerve 1: 140-145, 1978

39.Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.:

Protein measurement with the folinphenol reagent.

J Biol Chem 193: 265-275, 1951

40.Mertens, H.G., Balzereit, F., Leipert, H.:

The treatment of myasthenia gravis with immunosuppressive agents.

Eur Neurol 2: 321-329, 1969

41.Mittag, T., Kornfeld P., Tormay, A., Woo, C.:

Detection of anti-acetylcholine receptor factors in serum and thymus from patients with myasthenia gravis.

N Engl J Med 294: 691-694, 1976

42.Newsom-Davis, J., Pinching, A.J., Vincent, A., Wilson, S.G.:

Function of circulating antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: investigation by plasma exchange.

Neurology (NY) 28: 266-272, 1978

43.Oosterhuis, H.J.G.H., Limburg, P.C., Hummel-Tappel, E.,

The, T.H.:

Anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis

Part 2. Clinical and serological follow-up of individual patients.

J Neurol Sci 58: 371-385, 1983

44.Ossermann, K.E., Genkins, G.:

Studies in myasthenia gravis: review of a twenty-year experience
in over 1200 patients.

Mt Sinai J Med NY 38: 497-537, 1971

45.Patrick, J. and Lindstrom, J.:

Autoimmune response to acetylcholine receptor.

Science 180: 871-872, 1973

46.Peterson, E.A.:

Cellulosic ion exchangers.

In: Work, T.S., Work, E., eds. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol 2, Part II. Amsterdam, North Holland Publishing Co, 1970

47.Pirskanen, R., Bergström, K., Hammarström, L., Knutsson, E.,

Lefvert, A.K., Matell, G., Nilson, B.Y., and Smith, C.I.E.:

Neuromuscular safety margin - Genetical, immunological and electrophysiological determinants in relatives of myasthenic patients - A preliminary report.

Ann NY Acad Sci 377: 606-613, 1981

48.Reuther, P., Fulpius, B.W., Mertens, H.G., Hertel, G.:

Anti-acetylcholine receptor antibody under long-term azathioprine treatment in myasthenia gravis.

In: Dau, P.C., ed. Plasmapheresis and the immunobiology of myasthenia gravis. Boston: Houghton Mifflin, p. 329-342, 1979

49. Robb, S.A., Vincent, A., McGregor, M.A., McGregor, A.M., and Newsom-Davis, J.M.:
Acetylcholine receptor antibodies in the elderly and in Down's syndrome.
J Neuroimmunol 9: 139-146, 1985
50. Roberts, D.V., and Wilson, A.:
Physiology of neuromuscular transmission.
In: Greene, R. ed. Myasthenia Gravis. London, Heinemann :
p. 14-19, 1969
51. Santa, S., Engel, A.G., and Lambert, E.H.:
Histometric study of neuromuscular junction ultrastructure
1. Myasthenia gravis.
Neurology 22:71-82, 1972
52. Scheidegger, J.J.:
Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse.
Int Arch Allergy 7: 103, 1955
53. Schwartz, M., Lancet, D., Tarrab-Hazdai, R., and Fuchs, S.:
Effect of azathioprine on the affinity of antibodies against
acetylcholine receptor: analysis with purified antibodies.
Mol Immunol 16: 483-487, 1979

54. Seybold, M.E., Lindstrom, J.M.:

Serial anti-acetylcholine receptor antibody titers in patients with Myasthenia gravis: effects of steroid therapy.

In: Dau, P.C., ed. Plasmapheresis and the immunobiology of myasthenia gravis. Boston: Houghton Mifflin, p. 307-314, 1979

55. Simpson, J. A.:

Myasthenia gravis. A new hypothesis.

Scott Med J 5: 419-436, 1960

56. Strauss, A.J.L., Seegal, B.C., Hsu, K.C., Burkholder, P.M., Nastuk, W.L., Ossermann K.E.:

Immunofluorescence demonstration of a muscle-binding, complement-fixing serum globulin fraction in myasthenia gravis.

Proc Soc Exp Biol Med 105: 184-191, 1960

57. Sugiyama, H., Benda, P., Meunier, J., Changeux J.P.:

Immunological characterisation of the cholinergic receptor protein from Electrophorus electricus.

FEBS Lett 35: 124-128, 1973

58. Tindall, R.S.:

Humoral immunity in myasthenia gravis: biochemical characterization of acquired antireceptor antibodies and clinical correlations.

Ann Neurol 10: 437-447, 1981

59. Toyka, K.V., Drachman, D.B., Pestronk, A., Kao, I.:
Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse.
Science 190: 397-399, 1975
60. Toyka, K.V., Drachman, D.B., Griffin, D.E., Pestronk, A.,
Winkelstein, J.A., Fischbeck, K.H., Kao, I.:
Myasthenia gravis: study of humoral immune mechanism by passive
transfer to mice.
N Engl J Med 196: 125-131, 1977
61. Toyka, K.V., Becker, T., Fateh-Moghadam, A., Besinger, U.A.,
Brehm, G., Neumeier, D., Heininger, K. und Birnberger, K.L.:
Die Bedeutung der Bestimmung von Antikörpern gegen Acetylcholin-
receptoren in der Diagnostik der Myasthenia gravis.
Klin Wochenschr 57: 937-942, 1979
62. Toyka, K.V., Besinger, U.A., Heininger, K., Samtleben, W.,
Hein, D., Fateh-Moghadam, A., Gurland, H.J., Grabensee, B.:
Myasthenia gravis: The pathogenic role of antibodies to acetyl-
choline receptor and the effect of antibody depletion.
In: Borberg, H., Mertens, H.G., Reuther, P. eds. Plasma Exchange
Therapy. Stuttgart: Thieme Verlag, p.172-179, 1981

63. Vecchio, T.J.:

Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations.

N Engl J Med 274: 1171-1173, 1966

64. Viets, H.R. and Schwab, R.S.:

Thymectomy for Myasthenia Gravis.

Springfield, IL: Thomas, 1960

65. Vincent, A. and Newsom-Davis, J.:

Alpha-bungarotoxin and anti-acetylcholine receptor antibody binding to human acetylcholine receptor.

In: Ceccarelli, B., Clementi, F., eds. Advances in Cytopharmacology. Neurotoxins - Tools in Neurobiology, vol 3. New York, Raven : p. 267-278, 1979

66. Vincent, A. and Newsom-Davis, J.:

Absence of anti-acetylcholine receptor antibodies in congenital form of myasthenia gravis.

Lancet i: 441-442, 1979

67. Vincent, A.:

Immunology of acetylcholine receptors in relation to myasthenia gravis.

Physiol Rev 60: 756-824, 1980

68.Vincent, A. and Bilkhu, M.: Anti-acetylcholine receptor antibody - Use of polyethylene glycol as an aid to precipitation of antibody-receptor complexes in determination of light chain and subclass.

J Immunol Methods 51: 359-369, 1982

69.Walker, M.B.:

Treatment of myasthenia gravis with physostigmine.

Lancet i: 1200-12, 1934

70.Wilson, S.G., Vincent, A., Newsom-Davis, J.:

Acetylcholine receptor turnover in mice with passively transferred myasthenia gravis II. Receptor synthesis.

J Neurol Neurosurg Psychiat 46: 383-387, 1983

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern der Universität München (Direktor Prof. Dr. med. M. Knedel) in Zusammenarbeit mit der Neurologischen Klinik der Technischen Universität München (Direktor Prof. Dr. med. A. Struppler) durchgeführt.

Für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit am Institut für Klinische Chemie sowie für die Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Prof. Dr. M. Knedel.

Herrn Prof. Dr. med. A. Fateh-Moghadam möchte ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die vielen Anregungen bei der Durchführung und die großzügige Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit ganz besonders herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. K.V. Toyka (jetzt Neurologische Klinik der Universität Düsseldorf) und Herrn Priv. Doz. Dr. med. U.A. Besinger von der Neurologischen Klinik der Technischen Universität München für ihre unermüdliche und beispielhafte Hilfestellung und Kooperation in klinischen Fragen.

Frau J. Witthöft möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen ebenso herzlich danken, wie Frau J. Ermisch für das Zeichnen der Abbildungen.

LEBENS LAUF

15. 5. 1948 geboren in Zwiesel als Sohn des Polizeibeamten Karl Heininger und der Hausfrau Anna Heininger, geb. Maidl
- Sept. 1954 Einschulung Grundschule Zwiesel
- Sept. 1955 Fortsetzung der Grundschule in Traunstein
- Sept. 1958 Mathematisch-Naturwissenschaftliches Chiemgau-Gymnasium in Traunstein
- Juni 1967 Abitur am Chiemgau-Gymnasium
- Okt. 1967- Wehrdienstzeit
- März 1969
- SS 1969- Studium der Chemie an der Ludwig Maximilians-Universität München
- WS 1975/76
21. 11. 1975 Diplom der Chemie
- WS 1975/76- Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität München
- WS 1979/80
- April 1980- Praktisches Jahr an den Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf
- März 1981
30. 4. 1981 Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestanden
18. 5. 1981 Approbation
- seit Mai 1981 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Neurologischen Klinik der Universität Düsseldorf (Direktor Prof. Dr. med. H.-J. Freund)

